

## Caractérisation physico-chimique et microbiologique des fromages fermiers

**Auteur :** O, Quynh My

**Promoteur(s) :** Sindic, Marianne; 2526

**Faculté :** Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

**Diplôme :** Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

**Année académique :** 2018-2019

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/7711>

---

### 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.

---

# **CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET MICROBIOLOGIQUE DES FROMAGES FERMIERS**

**QUYNH MY O**

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2018-2019**

**CO-PROMOTEURS: PR. MARIANNE SINDIC & IR. AMAURY GÉRARD**

Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique<sup>1</sup> de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.

---

<sup>1</sup> Dans ce cas, l'autorité académique est représentée par les promoteurs membres du personnel enseignant de GxABT

# **CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET MICROBIOLOGIQUE DES FROMAGES FERMIERS**

**QUYNH MY O**

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2018-2019**

**CO-PROMOTEURS: PR. MARIANNE SINDIC & IR. AMAURY GÉRARD**

# Remerciements

---

Je souhaiterais tout d'abord remercier Amaury Gérard, mon encadrant, car c'est dans le cadre de son projet de doctorat que j'ai pu effectuer mon travail de fin d'études. Sans son aide, sa patience, sa bienveillance et ses innombrables corrections, il aurait été difficile pour moi de mener à bien mon TFE au Laboratoire Qualité & Sécurité des Produits Agroalimentaires de la faculté de Gembloux Agro-Bio Tech.

Je tiens également à remercier la Professeure Marianne Sindic qui m'a proposé ce sujet au sein de son unité Analyse, Qualité et Risques. De plus, ses recommandations et ses conseils lors de mes recherches de stage m'ont permis de me sentir aiguillée et soutenue.

Un petit mot pour mes camarades de la "Caravane" : Bérénice, Émilie et Soundous, qui m'ont accueillie chaleureusement au sein de leur bureau. Grâce à elles et Amaury, mes journées étaient aussi bien productives que remplies de bons moments.

Je remercie le Professeur Sébastien Massart et son équipe de m'avoir permis d'accéder à leur laboratoire de Phytopathologie du Centre de Recherches en Agriculture Urbaine de la faculté de Gembloux Agro-Bio Tech et plus particulièrement Mathilde Eck de m'avoir guidée dans les manipulations exécutées.

Je n'oublie pas le Professeur Georges Daube de l'Université de Liège ainsi que Monsieur Taminiau et Madame Burteau de chez Genalyse Partner (Liège), qui m'ont aidée dans l'analyse de mes échantillons, mais aussi le Professeur Yves Brostaux, du Laboratoire SIMa de la faculté de Gembloux Agro-Bio tech, pour ses conseils dans l'analyse statistique de mes résultats.

Pour terminer, j'ai une attention toute particulière pour ma famille ainsi que mes amies qui m'ont toujours encouragée et qui ont été d'un grand soutien tout au long de mon cursus académique.

# Abstract

---

The natural microbial community of cheese can originate from milk, equipment and production environment or be intentionally added. The main goal of this study was to investigate and characterize ecologically the microbial community of farmhouse cheeses. In this study, 26 farmhouse cheeses were investigated (fresh, soft, hard), made from raw or pasteurized milk, and from bovine, ovine or caprine origin. The microbiota of the samples was analysed by metagenetics using 16S rRNA amplicon sequencing. The sequences were grouped into operational taxonomic units (OTU) by phylotype at the species level.

Considering the reads obtained from all samples, 11 bacterial genera with a relative abundance above 0.1 % were identified. Two genera were dominant, namely *Lactococcus* and *Streptococcus*. The relative abundance of *Lactococcus* was always between 64.95 % and 97.12 %, depending on the type of cheese or the type of milk. *Streptococcus* has a relative abundance between 1.02 % and 29.40 %. By not taking those genera into account, 44 genera were then detected in the samples. *Brevibacterium*, *Bifidobacterium*, *Brachybacterium*, *Leuconostoc*, *Microbacterium*, *Staphylococcus* and *Bacteroides* were predominantly noticed at a relative abundance of 27.57 %, 21.09 %, 8.97 %, 6.19 %, 5.35 %, 5.28 % and 5.19 %, respectively.

Alpha diversity analysis (richness and diversity) did not show any statistical difference between the types of cheese, origins of the milk, and types of milks. However, beta-diversity (bacterial community composition) analysis highlighted a difference in the microbial environment between fresh cheeses and soft or hard cheeses, as well as between raw and pasteurized milk, and between cheeses from sheep and goat milk. The principal component analysis could not cluster the samples according to the type of cheese. Instead it revealed trends according to some genera.

Another objective was the physico-chemical characterisation of the samples (pH and  $a_w$ ). Fresh, soft and hard cheeses had an average pH ( $\pm$  standard deviation) of  $4.44 \pm 0.16$ ,  $5.63 \pm 0.57$  et  $5.74 \pm 0.19$ , respectively. The average  $a_w$  ( $\pm$  standard deviation) was respectively :  $0.99 \pm 0.00$ ,  $0.97 \pm 0.01$  et  $0.96 \pm 0.01$ .

# Résumé

---

La flore bactérienne présente au sein des fromages peut être originaire du lait de départ, de l'équipement et environnement de production ou provenir de l'ajout de ferments lactiques en cours de fabrication. Le but du travail a été d'étudier et de caractériser d'un point de vue écologique la communauté bactérienne présente au sein des fromages fermiers, à la sortie de production. L'étude s'est portée sur 26 fromages fermiers (frais, à pâtes molles ou à pâtes pressées) à base de lait cru ou pasteurisé, et d'origine animale variable : vache, chèvre ou brebis. La flore bactérienne a été étudiée par métagénomique. Le gène codant pour l'ARN ribosomique 16s a été séquencé. Les séquences obtenues ont été regroupées dans une table d'unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) par phylotypes jusqu'au niveau de l'espèce.

Au sein des échantillons de fromages, 11 genres bactériens ont été détectés à plus de 0,1 % d'abondance relative. Deux genres bactériens sont dominants au sein des fromages analysés : *Lactococcus* et *Streptococcus*. *Lactococcus* est présent au sein des échantillons à des abondances relatives élevées (64,95 % à 97,12 %) dans tous les types de fromage, pour tous les types de lait, et pour toutes les origines animales. L'abondance relative de *Streptococcus* variait entre 1,02 % et 29,40 %. En les masquant, le nombre de genres présents au sein de tous les échantillons augmente jusqu'à 44. Les principaux genres retrouvés sont *Brevibacterium*, *Bifidobacterium*, *Brachybacterium*, *Leuconostoc*, *Microbacterium*, *Staphylococcus* et *Bacteroides*. Avec le masquage des deux genres dominants, leur abondance relative est respectivement de 27,57 %, 21,09 %, 8,97 %, 6,19 %, 5,35 %, 5,28 % et 5,19 %.

En étudiant la diversité  $\alpha$  (la richesse et la diversité), aucune différence significative n'a pu être mise en évidence selon le type de fromage, le type de lait, ou l'origine du lait. Cependant, la diversité  $\beta$  a mis en avant une différence significative entre les fromages frais et les pâtes molles, ainsi qu'entre les fromages frais et les pâtes pressées. De plus, des différences significatives entre le type de lait utilisé et entre les fromages au lait de chèvre et de brebis ont été relevées. L'analyse en composante principale n'a pas permis de distinguer les types de fromages en fonction de leur communauté microbienne, mais a tout de même pu mettre en avant des tendances selon les genres pour certains fromages.

Un second objectif a été de caractériser les fromages selon des paramètres physico-chimiques tels que le pH ou l' $a_w$ . Les fromages frais, à pâtes molles et pâtes pressées ont présenté un pH moyen ( $\pm$  écart-type) de  $4,44 \pm 0,16$ ,  $5,63 \pm 0,57$  et  $5,74 \pm 0,19$ , respectivement. Leur activité d'eau moyenne ( $\pm$  écart-type) était respectivement de  $0,99 \pm 0,00$ ,  $0,97 \pm 0,01$  et  $0,96 \pm 0,01$ .

# Table des matières

---

|   |    |
|---|----|
| Introduction .....  | 1  |
| 1. Etat de l'art.....   | 3  |
| 1.1. Le lait : une matière première pour la production de fromage .....           | 3  |
| 1.1.1. Aspects généraux relatifs à la composition du lait.....                    | 3  |
| 1.1.2. La fraction protéique du lait .....  | 4  |
| 1.1.3. Les glucides du lait.....  | 5  |
| 1.1.4. La matière grasse laitière.....  | 5  |
| 1.1.5. Les vitamines et minéraux du lait .....                                    | 6  |
| 1.2. Le fromage.....  | 6  |
| 1.2.1. Procédés généraux de fabrication de fromage .....                          | 6  |
| 1.2.2. Les types de fromage .....   | 9  |
| 1.3. Microflore du fromage.....   | 13 |
| 1.3.1. Bactéries .....  | 13 |
| 1.3.2. Levures et moisissures .....   | 14 |
| 1.4. L'approche métagénomique .....   | 15 |
| 1.5. Micro-organismes d'altération et pathogènes du lait et du fromage.....       | 17 |
| 1.5.1. <i>Salmonella</i> spp. ....  | 18 |
| 1.5.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....   | 19 |
| 1.5.3. <i>Escherichia coli</i> .....  | 19 |
| 1.5.4. <i>Campylobacter</i> spp.....  | 19 |
| 1.5.5. <i>Listeria monocytogenes</i> .....  | 20 |
| 1.6. Risques microbiologiques liés à la consommation de fromages au lait cru..... | 20 |
| 2. Objectifs.....   | 22 |
| 3. Matériel et méthodes.....  | 23 |
| 3.1. Echantillonnage.....   | 23 |
| 3.2. Etude physico-chimique.....  | 23 |
| 3.3. Extraction ADN .....   | 24 |
| 3.4. Quantification de l'ADN .....  | 25 |
| 3.5. Préparation des bibliothèques pour le séquençage Illumina .....              | 26 |
| 3.6. Analyse Bio-informatique .....   | 27 |
| 3.7. Traitements Statistiques.....  | 28 |



|   |    |
|---|----|
| 4. Résultats et discussion .....  | 29 |
| 4.1. Etude physico-chimique.....  | 29 |
| 4.2. Environnement bactérien .....  | 31 |
| 4.2.1. Présentation générale.....   | 32 |
| 4.2.2. Interprétation .....   | 38 |
| 4.2.3. Selon le type de fromage .....   | 41 |
| 4.2.4. Selon le type de lait.....   | 48 |
| 4.2.5. Selon l'origine du lait .....  | 52 |
| 4.3. Diversité $\alpha$ .....   | 56 |
| 4.3.1. Etude de la richesse .....   | 56 |
| 4.3.2. Etude de la diversité .....  | 59 |
| 4.4. Diversité $\beta$ .....  | 62 |
| 4.4.1. Analyse en composantes principales .....   | 62 |
| 4.4.2. Analyse sur les OTUs .....   | 68 |
| 5. Conclusion.....  | 69 |
| 6. Bibliographie .....  | 72 |
| Annexe .....  | 80 |
| Annexe 1 : Paramètres physico-chimiques (Concentration d'ADN, pH, $a_w$ , MG, MS, Sel, Eau) des échantillons de fromages analysés. .... | 80 |

# Table des figures

|   |    |
|---|----|
| Figure 1: Structure Haworth du Lactose.....   | 5  |
| Figure 2: Les familles des fromages à partir d'un caillé lactique (Profession Fromager, 2016).....  | 10 |
| Figure 3: Les familles des fromages à partir d'un caillé mixte (HFD* : Taux d'humidité dans le fromage dégraissé) (Profession fromager, © Edition ADS, 2016). ....  | 12 |
| Figure 4: Graphique du % d'identité de séquence selon les régions variables et conservés du gène 16S rRNA (Schutz, juin-5-2019). ....   | 15 |
| Figure 5: Schéma explicatif de l'hybridation des amorces (fw et rv) avec les queues flottantes après la seconde PCR. Les couleurs ont différents rôles : Brun : Amorce des régions V1 – V3, jaune : Adaptateurs Illumina, rouge : séquence kappa, vert : Séquence Index. .... | 26 |
| Figure 6: Boîtes à moustaches des pH selon le type de fromage à 10-90 percentiles. ....   | 30 |
| Figure 7: Boîtes à moustaches des activités d'eau selon le type de fromage à 10-90 percentiles. ....  | 30 |
| Figure 8: Phyla bactériens présents au sein des échantillons de fromages à plus de 0,10 % en AR sans et avec masquage de <i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus</i> . ....  | 34 |
| Figure 9: Comparaison des AR des genres bactériens (> 0,1 %) au sein de tous les fromages étudiés sans et avec masquage de <i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus</i> . ....  | 37 |
| Figure 10: AR des genres bactériens (%) selon le type de fromage. ....  | 42 |
| Figure 11: AR (%) des genres bactériens au sein des fromages selon l'origine animale du lait avec masquage de <i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus</i> . ....   | 47 |
| Figure 12: AR des genres bactériens (%) selon le type de lait. ....   | 49 |
| Figure 13: AR (%) des genres bactériens dans les fromages selon le type de lait, avec masquage de <i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus</i> . ....   | 51 |
| Figure 14: AR des genres bactériens (%) dans les fromages selon l'origine du lait. ....   | 53 |
| Figure 15: AR (%) des genres bactériens au sein des fromages selon l'origine animale du lait avec masquage de <i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus</i> . ....   | 55 |
| Figure 16: Nombre d'OTUs observé selon le type de fromages, le type de lait et l'origine animale du lait. ....  | 57 |
| Figure 17: Indice de Chao1 selon le type de fromages, le type de lait et l'origine animale du lait. ....  | 58 |
| Figure 18: Indice de Shannon selon le type de fromage, le type de lait et l'origine animale du lait. ....   | 60 |
| Figure 19: Indice Inverse de Simpson selon le type de fromages, le type de lait et l'origine animale du lait. ....  | 61 |
| Figure 20: Graphiques des valeurs propres sans masquage (gauche) et avec masquage (droite). ....  | 62 |

|   |    |
|---|----|
| Figure 21: Graphe des variables (genres bactérien) selon les différentes composantes retenues sans masquage. La variable A représente <i>Lactococcus</i> , B est <i>Streptococcus</i> , C : <i>Brevibacterium</i> , D : <i>Bifidobacterium</i> et E : <i>Brachybacterium</i> . .....  | 63 |
| Figure 22: Position des individus sans masquage dans les dimensions 1 et 2. Les individus en orange représentent les fromages frais, les pâtes molles sont représentées en vert et les pâtes pressées en bleu. ....   | 64 |
| Figure 23: Graphe des variables avec masquage selon les dimensions 1, 2, 3 et 4. Les variables suivantes représentent un genre bactérien : C : <i>Brevibacterium</i> , D : <i>Bifidobacterium</i> , E : <i>Brachybacterium</i> , F : <i>Leuconostoc</i> , G : <i>Microbacterium</i> , H : <i>Staphylococcus</i> et I : <i>Bacteroides</i> ... | 65 |
| Figure 24: Graphe des individus avec masquage dans les dimensions 1 et 2. Les individus en orange représentent les fromages frais, les pâtes molles sont représentées en vert et les pâtes pressées en bleu. ....   | 66 |
| Figure 25: Graphe des individus avec masquage dans les dimensions 1 et 3. Les individus en orange représentent les fromages frais, les pâtes molles sont représentées en vert et les pâtes pressées en bleu. ....   | 66 |
| Figure 26: Graphe des individus avec masquage dans les dimensions 1 et 4. Les individus en orange représentent les fromages frais, les pâtes molles sont représentées en vert et les pâtes pressées en bleu. ....   | 67 |

# Table des tableaux

---

|   |    |
|---|----|
| Tableau 1: Tableau de comparaison de composition du lait de vache, de chèvre et de brebis (Kongo et al., 2016b; Martin et al., 2018; Renhe et al., 2019). .....   | 4  |
| Tableau 2: Genres bactériens présents dans différents fromages (C*: Cru, Pa*: Pasteurisé). .....  | 16 |
| Tableau 3: Critères de sécurité des denrées alimentaires (AFSCA, 2015). .....   | 17 |
| Tableau 4: Tableau récapitulatif relatif aux fromages analysés (Origine du lait, type de lait, types de fromages). .....  | 23 |
| Tableau 5: Les moyennes et écarts types de pH et d'a <sub>w</sub> selon le type de fromage des échantillons analysés. ....  | 29 |
| Tableau 6: Nombre de genres présents à 0,1 % et 0,01 % dans les échantillons selon le type de fromage, le type de lait et l'origine animale du lait, avec ou sans masquage des genres <i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus</i> . .... | 32 |
| Tableau 7: AR (%) des genres bactériens au sein des échantillons sans et avec masquage de <i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus</i> . ....   | 35 |
| Tableau 8: Nombres de genres bactériens selon le type de fromages avec ou sans masquage de <i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus</i> . ....  | 41 |
| Tableau 9: AR (%) des genres bactériens selon les types de fromages. ....   | 43 |
| Tableau 10: AR (%) des genres bactériens selon le type de fromage avec masquage de <i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus</i> . ....  | 48 |
| Tableau 11: Nombre de genres bactériens dans les fromages selon le type de lait sans ou avec masquage de <i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus</i> . ....  | 48 |
| Tableau 12: Nombre de genres bactérien présent dans les fromages selon l'origine animale du lait sans et avec masquage de <i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus</i> . ....   | 52 |
| Tableau 13: Nombre de fromages selon le type de fromage et origine animale du lait utilisé. ....  | 54 |
| Tableau 14: Nombres d'OTUs moyens, avec écarts types, médianes, et quartiles (25 % et 75 %). ..   | 56 |
| Tableau 15: Indices de Chao1 moyens, avec écarts types, médianes, et quartiles (25 % et 75 %). ....   | 57 |
| Tableau 16: Indices de Simpson Inverse moyens, avec écarts types, médianes, et quartiles (25% et 75%). ....   | 59 |
| Tableau 17: Indices de Shannon moyens, avec écarts types, médianes, et quartiles (25% et 75%). ....   | 59 |
| Tableau 18: Part d'information exprimé en pourcentage apporté par les axes retenus sans masquage et avec masquage. ....   | 62 |

# Tables des abréviations et symboles

---

|                |  |
|----------------|--|
| <              | Inférieur à  |
| >              | Supérieur à  |
| ≤              | Inférieur ou égal                                  |
| %              | Pourcentage  |
| °C             | Degré Celsius                                      |
| μl             | Microlitre   |
| ACP            | Analyse en composantes principales                 |
| ADN            | Acide désoxyribonucléique                          |
| AMOVA          | Analyse moléculaire de la variance                 |
| ANOVA          | Analyse de la variance                             |
| AR             | Abondance relative                                 |
| ARN            | Acide ribonucléique                                |
| a <sub>w</sub> | Activité d'eau                                     |
| C              | Cru  |
| CE             | Commission européenne                              |
| cm             | Centimètre   |
| Cu             | Cuivre   |
| EU             | Union européenne                                   |
| F              | Fromage frais                                      |
| Fe             | Fer  |
| fw             | Forward  |
| g              | Gramme   |
| GLM            | Modèle linéaire généralisé                         |
| h              | Heure  |
| HALAB          | Bactéries lactiques alcalinophile et halotolérante |
| HFD            | Humidité du fromage dégraissé                      |
| HOMOVA         | Analyse moléculaire de l'homogénéité               |
| Ig             | Immunoglobuline                                    |
| J0             | Jour 0   |
| kg             | Kilogramme   |
| L              | Litre  |
| LAB            | Bactéries lactiques                                |
| M              | Fromage à pâte molle                               |
| m/v            | masse/volume                                       |
| ml             | Millilitre   |
| MG             | Matière grasse                                     |
| MS             | Matière sèche                                      |
| N°             | Numéro   |
| n              | Nombre   |
| ng             | Nanogramme   |
| OTU            | Unité taxonomique opérationnelle                   |

|          |   |
|----------|---|
| P        | Fromage à pâte pressée                                |
| Pa       | Pasteurisé  |
| PCR      | Polymerase Chain Reaction                             |
| p-valeur | Valeur de probabilité                                 |
| qPCR     | Polymerase Chain Reaction quantitative                |
| rpm      | Rotation par minute                                   |
| rv       | Reverse   |
| SEC      | Entérotoxine staphylococcique C                       |
| SHU      | Syndrome hémolytique et urémique                      |
| spp      | Plusieurs espèces                                     |
| STEC     | <i>Escherishia Coli</i> producteur de Shigatoxines    |
| T°       | Température   |
| UV       | Ultra-violet  |
| V1       | Région variable 1                                     |
| V3       | Région variable 3                                     |
| VTEC     | <i>Escherishia Coli</i> producteur de vérocytotoxines |
| α        | Alpha   |
| β        | Béta  |
| δ        | Delta   |
| κ        | Kappa   |

# Introduction

---

En Belgique, la production de fromage est en croissance constante. En effet, entre 2015 et 2016, les productions de fromages frais, nature et chèvre ont augmenté respectivement de 8,4 %, 11,5 % et 13,9 % (Statbel, 2017). Ces statistiques regroupent la globalité de fromages produits en Belgique. Différents types de fromages sont à distinguer, selon les techniques de production : les fromages industriels, artisanaux et fermiers (Roche, 2018). Ces catégories se différencient selon le type de lait utilisé ou selon son origine. Ainsi, la plupart des fromages industriels sont fabriqués à base de lait pasteurisé et standardisé, dans le but de répondre aux critères exigés par la grande distribution. Les fromages artisanaux sont souvent à base de lait cru, pouvant provenir d'une ferme voisine. Pour s'appeler fromage fermier, le lait doit être transformé en fromage au sein même de la ferme où il a été produit (Roche, 2018). L'étude présentée dans ce document se focalisera sur les fromages fermiers belges.

La consommation de fromages fermiers peut susciter certains problèmes. En effet ceux-ci sont principalement fabriqués à base de lait cru, n'ayant donc subi aucun traitement thermique. Par conséquent, le risque de présence de micro-organismes pathogènes existe. Par exemple, en mai dernier, en France, deux décès liés à la consommation de fromage au lait cru ont été rapportés dans la presse. Ces décès étaient liés à la listériose, une toxi-infection d'origine alimentaire causée par *Listeria monocytogenes*. Par rapport à *Campylobacter*, la listériose est rare. En 2017, 70 % des cas de toxi-infection alimentaire sont dus à *Campylobacter* (EFSA et al., 2018). Cependant, les toxi-infections alimentaires dues à *L. monocytogenes* sont en hausse entre 2012 et 2017 (EFSA et al., 2018; Gérard et al., 2018). En 2017, 2480 cas d'infection par listériose ont été identifiés au sein des 28 États membres de l'Union européenne (EU) (EFSA et al., 2018). Parmi ces cas, la maladie a causé 227 décès, soit un taux de mortalité de 9 % en 2017 au sein de l'UE (EFSA et al., 2018). Cette bactérie figure parmi les micro-organismes pathogènes les plus fréquemment rencontrés dans le domaine alimentaire. En effet, *L. monocytogenes* pouvant se développer à des températures de réfrigération, un refroidissement rapide du lait cru avant sa transformation n'est pas suffisant pour garantir sa sécurité sanitaire (AFSCA, 2015; Gérard et al., 2018).

Malgré les avis controversés, il existe bon nombre d'aspects positifs liés à la consommation du lait cru et de ses dérivés (Nero et al., 2019). L'utilisation de lait cru permet de créer un produit à l'environnement bactérien riche en comparaison d'une denrée au lait pasteurisé. Cette flore microbienne constitue une plus-value pour la texture ou la saveur des fromages (Bachmann et al., 2011; O'Sullivan et al., 2017). Un autre point positif lié à la présence de cette flore résidente est le caractère probiotique de certaines espèces, ce qui peut être bénéfique pour la santé humaine et notamment pour la flore intestinale (Nero et al., 2019). Ces bactéries ont également la capacité de produire des composés antimicrobiens empêchant la croissance de certains pathogènes (Nero et al., 2019).

L'étude proposée dans ce document s'inclut dans un projet doctoral de quatre ans. Son but principal est, dans un premier temps, d'étudier la communauté bactérienne associée aux fromages fermiers. Ainsi, les différents genres bactériens seront déterminés par métagénomique et classés selon les types de fromages, les types de lait, et l'origine animale du lait. De plus, une caractérisation écologique des populations bactériennes sera proposée. La suite du projet global, non réalisée par l'étudiante en mémoire, portera sur une mise en corrélation des paramètres physico-chimiques du milieu et de la communauté bactérienne avec la croissance de *L. monocytogenes*. Une meilleure compréhension des facteurs influençant la croissance de *L. monocytogenes* pourrait entraîner une maîtrise accrue de la sécurité sanitaire des aliments, et en particulier des fromages au lait cru.

La partie introductive sera consacrée dans un premier temps à la matière première du fromage : le lait. Ensuite, les différents types de fromages seront présentés, selon la méthode de caillage. Les communautés bactériennes du lait et des fromages sont détaillées d'après la littérature. Les risques liés à la consommation du lait cru et des fromages, ainsi que les techniques d'assainissement du lait complètent cette partie bibliographique.



# 1. État de l'art

---

## 1.1. Le lait : une matière première pour la production de fromage

Le fromage est obtenu par la coagulation du lait traité thermiquement (pasteurisation ou stérilisation) ou non (lait cru) (Kongo et al., 2016a). Le fromage peut être produit à l'échelle industrielle ou artisanale, mais certaines étapes de fabrication diffèrent. Ce projet se focalisera sur les procédés artisanaux utilisés au sein des exploitations agricoles.

La consommation du lait cru et de ses dérivés suscite de nombreuses questions au sein de la population (Nero et al., 2019). En effet, selon le Règlement (CE) N° 853/2004, le lait cru est défini comme « produit par la sécrétion de la glande mammaire d'animaux d'élevage et non chauffé à plus de 40°C, ni soumis à un traitement d'effet équivalent » (DiversiFerm, 2014). En d'autres termes, en comparaison au lait pasteurisé, sa microflore est plus importante et diversifiée, entraînant un risque plus élevé de contamination par des micro-organismes pathogènes (O'Callaghan et al., 2019). Par conséquent, sa conservation doit se faire à un maximum de 6 °C, afin de ne pas favoriser la prolifération des bactéries pathogènes déjà présentes dans le lait (Règlement (CE) N°853/2004). La microflore du lait cru sera détaillée ultérieurement dans ce document.

### 1.1.1. Aspects généraux relatifs à la composition du lait

Le lait contient principalement de l'eau, des protéines et des produits azotés non protéiques, du lactose, et de la matière grasse (Tableau 1). Les teneurs pour chaque composant varient selon l'espèce, la santé de l'animal, la saison, l'environnement, et la phase de lactation (Kongo et al., 2016b; O'Sullivan et al., 2017; Renhe et al., 2019). Le lait contient également des vitamines et des minéraux, des éléments importants, notamment pour le bon développement du nouveau-né.

De manière générale, les teneurs sont plus élevées dans le lait de brebis par rapport aux laits de vache et de chèvre (Tableau 1). Les taux de lipides sont différents selon l'espèce, et plus spécifiquement le profil d'acides gras. La proportion d'acide gras courte chaîne dans la matière grasse des laits de chèvre et de brebis est plus importante que celle du lait de vache (Jeantet et al., 2018). Les caséines de brebis diffèrent des autres espèces en termes de composition et séquence en acides aminés (Gaucheron, 2018). Avec cette richesse en protéines, durant la coagulation, le caillé est plus ferme, et plus facile à travailler (Martin et al., 2018).

**Tableau 1: Tableau de comparaison de composition du lait de vache, de chèvre et de brebis** (Kongo et al., 2016b; Martin et al., 2018; Renhe et al., 2019).

| Composition (g/ 100g)          | Vache | Chèvre | Brebis |
|--------------------------------|-------|--------|--------|
| <b>Matière sèche totale</b>    | 12,7  | 12,5   | 19,1   |
| <b>Lipides</b>                 | 3,7   | 3,8    | 7,5    |
| <b>Caséines</b>                | 2,6   | 2,6    | 4,3    |
| <b>Protéines du lactosérum</b> | 0,6   | 0,4    | 1,1    |
| <b>Lactose</b>                 | 4,8   | 4,1    | 5,4    |
| <b>Cendres</b>                 | 0,7   | 0,8    | 1,1    |

La proportion d'eau dans le lait varie de 81 à 91 % selon l'espèce (FAO, 2019). L'eau possède différentes fonctions dans le lait, telles que l'hydratation des nouveau-nés, un rôle de solvant favorisant les interactions chimiques entre micro- et macro nutriments, ou encore un rôle technologique pour l'aspect du produit transformé (Guétouache et al., 2014; Renhe et al., 2019).

### 1.1.2. La fraction protéique du lait

Les caséines constituent environ 80 % des protéines du lait. Il existe différentes catégories de caséines, dont les quatre principales sont  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  (Jerónimo et al., 2016). En s'associant, elles forment une micelle de caséine, et jouent un rôle important dans la structure et la stabilité du fromage. Lors de la production de yaourt et de fromage, la stabilisation du réseau protéique de micelles de caséines est permise par le phosphate de calcium (Kongo et al., 2016b). La micelle de caséine se compose à 94 % de protéines, les 6 % restants correspondant aux sels. La fabrication de fromage ou de yaourt se base sur la déstabilisation de la structure, grâce à des modifications des propriétés physico-chimiques de la solution (Kongo et al., 2016b; O'Callaghan et al., 2019; Renhe et al., 2019). Pour produire du fromage, de la présure est généralement ajoutée (Fagan et al., 2017). Celle-ci contient de la chymosine, une enzyme capable d'hydrolyser la caséine  $\kappa$ . Ce phénomène engendre une déstabilisation des micelles de caséines et, in fine, la coagulation du lait sous forme d'un gel appelé caillé (Huppertz et al., 2018). La présence de  $\text{Ca}^{2+}$  favorise cette coagulation que la polymérisation des micelles (Guétouache et al., 2014).

En dehors des caséines, le lait contient d'autres protéines, notamment les protéines du lactosérum. Parmi celles-ci figurent majoritairement l' $\alpha$ -lactalbumine et la  $\beta$ -lactoglobuline et, minoritairement, les immunoglobulines (IgG1, IgG2, IgA et IgM) et la lactoferrine (O'Callaghan et al., 2019). La  $\beta$ -lactoglobuline représente 50 % des protéines du lactosérum. Elle se présente sous la forme d'un dimère possédant un groupement thiol, réactif après chauffage. L' $\alpha$ -lactalbumine représente environ 20 % des protéines du lactosérum. Il s'agit d'une métalloprotéine se liant aux ions de  $\text{Ca}^{2+}$  (Renhe et al., 2019).

La présence d'enzymes au sein du lait est importante. Ces dernières sont sensibles à la chaleur, et constituent ainsi un contrôle de l'efficacité du traitement thermique du lait.

Par exemple, une désactivation totale de la phosphatase alcaline doit être observée suite à un traitement thermique de pasteurisation (DiversiFerm, 2014). Un barème de pasteurisation adéquat ne doit toutefois pas résulter en la destruction de la lactose peroxydase, car elle correspond à l'apparition d'un goût de cuit. Les enzymes du lait donnent également une indication sur la qualité hygiénique du lait. Le lait possède une activité catalase naturelle. La variation de cette activité est une indication d'une éventuelle contamination par des micro-organismes (Vignola, 2010; Maubois, 2018).

Les principales classes d'enzymes présentes au sein du lait sont : les oxydoréductases telles que la peroxydase, la xanthine-oxydase et la catalase, les transférases telles que la lactose synthétase et la ribonucléase, et enfin les hydrolases comme la lipase, la phosphatase alcaline, la phosphatase acide, la protéase, l'amylase et le lysozyme (Vignola, 2010; DiversiFerm, 2014; Fox, Cogan, et al., 2017).

### 1.1.3. Les glucides du lait

Le lactose est le sucre présent en plus grande quantité dans le lait (Jerónimo et al., 2016; Renhe et al., 2019). Selon l'espèce, le lactose est présent entre 4,8 et 7,0 % (g/100g lait) (Jerónimo et al., 2016; Panthi et al., 2017; Renhe et al., 2019). Il s'agit d'un disaccharide composé de D-glucose et de D-galactose liés par une liaison  $\beta$ -(1-4) (Figure 1). Ces deux sucres possèdent une extrémité réductrice. Le lactose est le substrat de la fermentation par les bactéries lactiques (LAB), un phénomène nécessaire à l'obtention du yaourt ou du fromage (Guetouache et al., 2014; Hayaloglu, 2016).

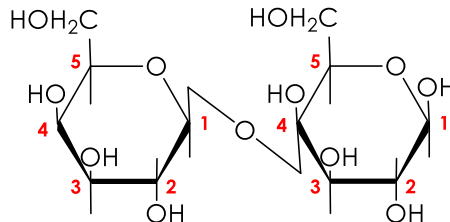


Figure 1: Structure Haworth du Lactose.

Le lactose est sensible à la réaction de Maillard, un mécanisme de brunissement non enzymatique influençant les caractéristiques organoleptiques des produits (Renhe et al., 2019). Cette réaction dépend de la température, de l'activité d'eau ( $a_w$ ), des sucres, des acides aminés et de l'effet catalyseur (Renhe et al., 2019).

### 1.1.4. La matière grasse laitière

La matière grasse est une des sources principales d'énergie dans le lait avec les glucides. La quantité totale de lipides présente au sein du lait est d'environ 4 % (g/100g de lait) (Kongo et al., 2016b). Les lipides majoritairement présents dans les produits laitiers sont les acides gras, les triacylglycérols et les phospholipides. Ces derniers comprennent le cholestérol, la phosphatidylcholine, la sphingomyéline, les glycolipides, les gangliosides, les glycoprotéines membranaires et protéines appelés la membrane du globule gras du lait. Les teneurs en acides gras saturés et insaturés diffèrent selon l'espèce (Jeantet et al., 2018). Par

exemple, les laits de vache et de chèvre sont faibles en acides gras polyinsaturés (Guetouache et al., 2014).

La matière grasse laitière est résistante à l'oxydation grâce à la présence naturelle d'antioxydants et d'acides gras saturés. Cependant, l'oxydation de la matière grasse laitière peut être induite par la présence de métal (par exemple le cuivre) ou suite à l'exposition à la lumière (Renhe et al., 2019).

### 1.1.5. Les vitamines et minéraux du lait

Des vitamines sont naturellement présentes dans le lait de vache, liposolubles (A, D, E, K) ou hydrosolubles (thiamine (B1), riboflavine (B2), etc.) (DiversiFerm, 2014; Guetouache et al., 2014).

Enfin, les minéraux jouent un rôle important dans la composition des micelles de caséine, et donc dans la structure tridimensionnelle du fromage (Guetouache et al., 2014). Ces oligo-éléments ont également des rôles technologiques. Lors de l'augmentation de la température, le Fe et le Cu forment un complexe sur la membrane du globule gras et augmentent l'oxydation de la matière grasse (Renhe et al., 2019).

## 1.2. Le fromage

Le fromage est le produit de la coagulation du lait de différentes espèces (vache, brebis, bufflonne ou chèvre). Cette coagulation peut se faire de manière complète, partielle ou à l'aide de techniques externes. La matière première peut avoir subi un premier traitement thermique (pasteurisation/thermisation) ou être utilisée telle quelle (lait cru). Comme dit au point 1.1.2, c'est en modifiant les conditions physico-chimiques du lait qu'il est possible d'obtenir différentes textures, saveurs et structures de fromages (Kongo et al., 2016b; FAO, 2019). Il existe de nombreux types de fromages, qui diffèrent par les technologies de fabrication : des fromages frais ou affinés, à pâte pressée ou molle, à pâte cuite ou non, ou encore à pâte fleurie ou lavée.

### 1.2.1. Procédés généraux de fabrication de fromage

#### 1.2.1.1. *Prétraitement du lait*

Dans le cas de la production de fromage au lait cru, le lait doit être transformé dans les 12h qui suivent la traite. Cependant, si le lait cru est refroidi à 4 - 12 °C, il peut être transformé dans les 48 h suivant la traite (Bachmann et al., 2011). Le lait cru peut subir un traitement thermique appelé la thermisation (65 °C durant 15 secondes) afin de diminuer significativement la quantité de micro-organismes pathogènes, tout en conservant les propriétés requises pour la production d'un fromage (Johnson, 2011; Fox, Cogan, et al., 2017). Il est important de bien veiller à respecter la chaîne du froid après la traite afin de diminuer le risque de prolifération des espèces bactériennes potentiellement nocives pour le consommateur, mais aussi pour conserver la qualité du lait (Gassi et al., 2017).

#### 1.2.1.2. *Caillage*

La coagulation du lait est une étape cruciale pour la fabrication de fromage. Au cours de celle-ci, le lait passe de l'état liquide à l'état solide, par la formation d'un gel ou

coagulum, appelé caillé (Gassi et al., 2017). Il existe deux techniques principales de coagulation : la voie de l'acidification, également appelée voie lactique, et la voie enzymatique. Dans un procédé artisanal, l'acidification s'obtient via l'ajout de ferments, détaillés ultérieurement dans ce point. Un produit caractéristique obtenu par cette voie est le fromage frais, tel que la maquée, qui présente une acidité prononcée (généralement  $\text{pH} < 5,00$ ). La voie enzymatique consiste en l'ajout de présure dans un lait peu acidifié. Cette voie est caractéristique de la plupart des fromages à pâte pressée. L'acidité observée parmi ce type de caillé est d'une valeur intermédiaire ( $5,50 < \text{pH} < 6,60$ ) (Gassi et al., 2017). Généralement, les deux techniques sont combinées, de façon plus ou moins intense, dans toutes les technologies fromagères (Desmasures, 2014).

- La voie lactique

L'acidité est un facteur important dans la formation du caillé (Johnson, 2011; Fox, Cogan, et al., 2017). L'acidification est obtenue par l'ajout de bactéries lactiques qui transforment l'acide lactique en lactate (Fox & McSweeney, 2017). Selon le prétraitement thermique subi ou non, ainsi que selon le type de fromage, les ferments ajoutés peuvent varier. Les espèces de ferments les plus fréquentes sont *Lactococcus lactis* subsp *lactis* et/ou *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*. Une autre alternative est l'ajout d'un échantillon de lactosérum conservé suite à la transformation fromagère précédente, et incubé durant une nuit, comme dans le cas de la production de Parmigiano Reggiano (Fox & McSweeney, 2017). Il existe deux types de ferments lactiques : les mésophiles et les thermophiles (Hayaloglu, 2016; Parente et al., 2017). Les mésophiles interviennent dans le développement de la croûte lors de la fabrication de fromages à pâte non cuite (la température ne dépassant jamais 40 °C au cours du procédé), tandis que les thermophiles sont utilisés dans le cas des fromages à pâte cuite (température > 50 °C), par exemple les fromages italiens de type « Grana » ou l'Emmental (McSweeney et al., 2004; Fox & McSweeney, 2017; Fox, Cogan, et al., 2017; McSweeney et al., 2017). Les micro-organismes mésophiles ont la capacité de proliférer dans un intervalle de température compris entre 25°C et 40°C (Fröhlich-Wyder et al., 2017; Perin et al., 2019). Ils comprennent des lactococci et des *Leuconostoc* (Hayaloglu, 2016). Différents genres bactériens figurent dans cette catégorie, incluant *Lactococcus* (*lactis* ssp. *Lactis* et/ou *lactis* ssp. *cremoris*), *Lactobacillus* (*paracasei* et *ramnosus*), *Leuconostoc*, et *Staphylococcus* (Cotter et al., 2017; Fox, Cogan, et al., 2017; Perin et al., 2019). De plus, les lactococci ont la capacité de produire du glucose à partir de l'acide lactique, et sont considérés comme homofermentaires (Fröhlich-Wyder et al., 2017). Les *Leuconostoc* spp. métabolisent le lactose en lactate, éthanol, et surtout CO<sub>2</sub>, dont les bulles de gaz aboutissent à la formation d'yeux dans les fromages, par exemple de type Emmental (Fröhlich-Wyder et al., 2017). Les *Leuconostoc* spp. sont hétérofermentaires et ont l'avantage de résister à des valeurs de pH faibles, ce qui constitue un avantage en fin d'acidification (Fröhlich-Wyder et al., 2017). Parmi les ferments thermophiles figurent *Streptococcus thermophilus* et des *Lactobacillus* thermophiles tels que *Lactobacillus helveticus* et *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* (Hayaloglu, 2016; Fox, Cogan, et al., 2017; Fröhlich-Wyder et al., 2017).

#### - La voie enzymatique

L'appellation « présure » est consacrée à un mélange d'enzymes animales utilisé pour la formation du caillé (Andrén, 2011). Cependant, il existe également différents substituts de présure appelés « coagulants », d'origine végétale ou microbienne (Moschopoulou, 2011; Jaros et al., 2017). Depuis les années 1960, des coagulants microbiens, en réalité des protéases purifiées, sont obtenus à partir d'espèces fongiques comme *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* ou *Cryphonectria parasitica* (Andrén, 2011; Horne et al., 2017; Jaros et al., 2017). Dans les années 1980, la technologie des ADN recombinants a permis la production de chymosine en clonant le gène de production de protéine au sein d'*Escherichia coli* (Andrén, 2011; Uniacke-Lowe et al., 2017). La présure est utilisée pour la production de fromage depuis des milliers d'années (Andrén, 2011; Moschopoulou, 2011). Initialement, celle-ci se compose d'un mélange de chymosine et de pepsine, deux enzymes sécrétées dans la caillette des jeunes ruminants (Moschopoulou, 2011; Horne et al., 2017; Jaros et al., 2017; Uniacke-Lowe et al., 2017). Ces deux enzymes possèdent une activité protéolytique permettant la coagulation du lait pour la production de fromage (Andrén, 2011; Horne et al., 2017). En hydrolysant les  $\kappa$ -caséines, l'action de ces enzymes élimine les « cheveux » autour de la membrane du globule gras, permettant la réduction des répulsions stériques et électrostatiques entre les micelles (Fagan et al., 2017). Le substitut de présure végétale peut être extrait des fleurs de *Cynara* spp. (Horne et al., 2017).

#### 1.2.1.3. *Évacuation du sérum*

Après avoir découpé le caillé formé, une réduction de la teneur en lactose peut avoir lieu afin de limiter la production d'acide lactique durant l'affinage, en soutirant une certaine proportion de sérum, et en diluant la phase soluble du caillé avec de l'eau (Düsterhöft et al., 2017; Farkye et al., 2017).

Ensuite, l'égouttage, ou déshydratation du caillé, permet la concentration des éléments du lait. À ce stade, le caillé se sépare du lactosérum, par le phénomène de synérèse (Kongo et al., 2016a). Grâce à la présence de présure, à l'acidité et à la température, le coagulum se contracte en éjectant le lactosérum (Guetouache et al., 2014; Gassi et al., 2017).

#### 1.2.1.4. *Salage*

Le sel, en plus d'avoir un rôle de conservateur alimentaire, impacte les saveurs ainsi que le régime alimentaire du consommateur (Dusterhoft et al., 2017; Guinee et al., 2017). Le salage des fromages peut se faire de différentes manières : l'immersion de la meule de fromage dans de la saumure durant une période de temps, ou à sec à l'aide de sel fin ou de gros sel (Guinee et al., 2017; Ozturkoglu-Budak et al., 2017).

#### 1.2.1.5. *Affinage*

Enfin, afin de développer l'aspect, la texture, la composition, les saveurs et arômes du fromage final vient l'étape de l'affinage (Kongo et al., 2016a; Mietton et al., 2018). La durée de cette étape peut varier d'un jour à plusieurs mois, voire plusieurs années, en

fonction du type de fromage et de l'affinage désiré (Mietton et al., 2018). D'autres facteurs sont à prendre en considération durant l'affinage, notamment la température et l'humidité de la pièce (Ozturkoglu-Budak et al., 2017).

## 1.2.2. Les types de fromage

La classification des fromages sera détaillée selon le type de caillé (lactique ou présure et mixte) ainsi que selon le type d'affinage.

Il existe différents types de caillés : le caillé lactique et le caillé mixte. Le caillé lactique est obtenu grâce à une fermentation prolongée du lactose par des bactéries lactiques, ou par l'ajout d'agent acidogène dans le cas de procédés plus industriels (ex. : glucono- $\delta$ -lactone) (Mietton et al., 2018). Ce type de fromage contient également une faible quantité de présure (1-2 ml/ 100L de lait) (Mietton et al., 2018). Le caillé mixte à tendance présure résulte d'un procédé au cours duquel les voies lactiques et enzymatiques sont utilisées en parallèle. (Desmasures, 2014).

### 1.2.2.1. Les caillés lactiques

Les fromages lactiques présentent un taux d'humidité du fromage dégraissé (HFD) élevé (80 % - 90 %) (Mietton et al., 2018). Ceux-ci sont obtenus par acidification via des bactéries lactiques ajoutées à une température de 20 à 28 °C pendant 12 à 18h, pour obtenir un pH final de l'ordre de 4,60 (Mietton et al., 2018). La famille des fromages à pâte lactique est composée de cinq sous-familles (Figure 2): les pâtes lactiques fraîches (ex. : Petit-Suisse), les pâtes lactiques enrichies fraîches (ex. : Boursin), les pâtes lactiques à croûte fleurie (ex. : Neufchâtel), les pâtes lactiques enrichies à croûte fleurie (ex. : Saint-Félicien), et les pâtes lactiques à croûte lavée (ex. : Epoisses) (Profession Fromager, 2016). Tous ces produits sont obtenus par un égouttage spontané du caillé.

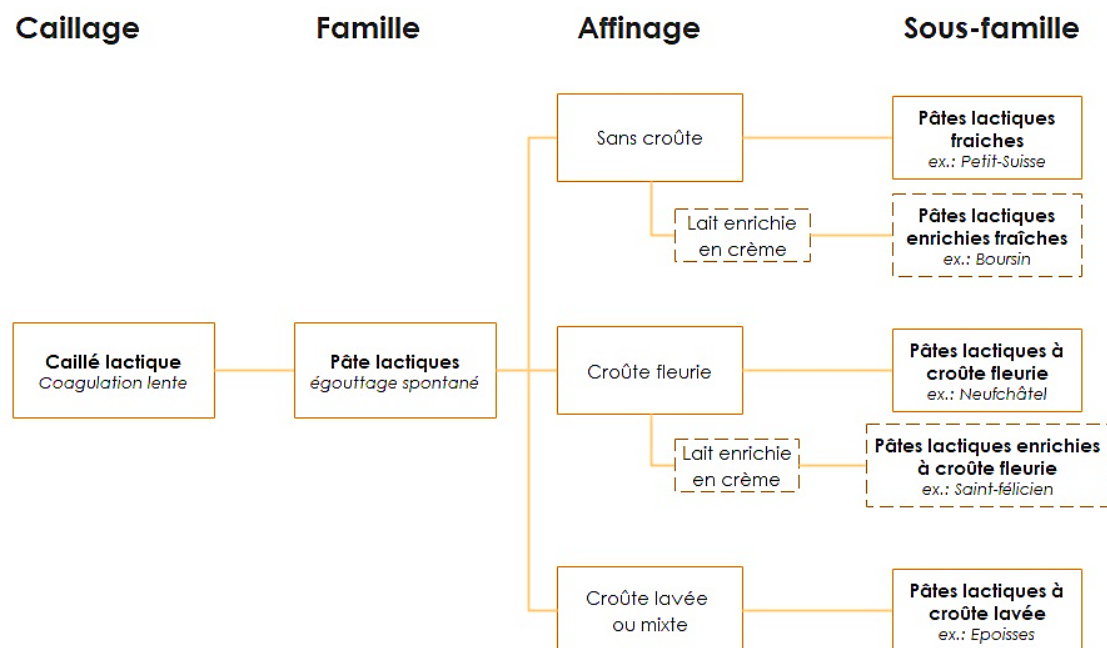




Figure 2: Les familles des fromages à partir d'un caillé lactique (Profession Fromager, 2016).

### 1.2.2.2. Les caillés mixtes

L'ajout de présure pour obtenir le caillé mixte se fait à une température de 28 à 34 °C sur du lait acidifié au préalable par des bactéries lactiques (Mietton et al., 2018). Parmi les fromages à caillé mixte et présure (Figure 3), 4 familles peuvent être distinguées : les pâtes molles, les pâtes pressées non cuites, les pâtes pressées mi-cuites et les pâtes pressées cuites (Profession Fromager, 2016). La température de cuisson est le paramètre qui distingue les pâtes pressées non cuites, mi-cuites, et cuites.

#### a) Les pâtes molles

Parmi les fromages à pâte molle, quatre types d'affinages sont différenciés : sans croûte (ex. : Feta), à croûte fleurie (ex. : Camembert), à croûte lavée (ex. : Maroilles), et les bleus (ex. : Roquefort ou Gorgonzola) (Profession Fromager, 2016). Dans le cas la Feta, l'ajout de présure se fait à 32 - 34 °C et le caillage dure 45 à 50 minutes (Hayaloglu, 2017). Après coagulation, le caillé est coupé et égoutté en moules, à 16 -18 °C durant 18 à 24h. Ensuite, le fromage est démoulé, coupé en morceaux et salé à sec. Cette étape est suivie d'un salage en saumure durant 1 à 2 jours. Le taux final en sel doit être environ à 3 %. L'affinage se déroule à 16 - 18 °C durant 10 à 15 jours. À ce stade, le pH est de 4,60. Après cette première maturation, l'humidité est inférieure à 56% et le pH se situe entre 4,40 – 4,60. La deuxième maturation se fait à 4°C durant au moins 60 jours (Hayaloglu, 2017).

Pour le Camembert, un fromage à pâte molle à croûte fleurie, la coagulation se fait à 32 – 35 °C. L'égouttage se fait durant les premières heures à 26 °C – 28 °C et diminue progressivement jusqu'à 20 °C. À ce stade, le caillé a un pH de 4,60 – 4,70. Ensuite, le fromage est salé à sec et affiné à 8 – 15 °C, avec une humidité relative d'environ 80 - 85 %, durant minimum 21 jours (Ozturkoglu-Budak et al., 2017; Spinnler, 2017).

Les pâtes molles à croûte lavée, telles que le Maroilles, se caractérisent par une croûte lisse, souple, de couleur jaune – orange (Goudédranche et al., 2017a). Les étapes de production sont similaires au fromage à croûte fleurie, mais l'affinage implique des lavages fréquents des fromages. L'affinage dure plus longtemps que pour les croûtes fleuries, et à une humidité élevée (> 95 %). L'apport des ferments d'affinage peut se faire de différentes manières : pulvérisation, trempage ou lavage (Goudédranche et al., 2017a).

Les fromages bleus sont caractérisés par la présence de moisissures en leur cœur, généralement de l'espèce *Penicillium roqueforti*. Ils présentent des gradients prononcés de pH, de sel et d'activité d'eau entre le cœur et la surface (Desmasures, 2014). Selon l'intensité d'arômes souhaitée, forte ou douce, la coagulation du lait se fait respectivement à 28 - 30 °C ou à 35 – 40 °C, et le caillé présente un pH voisin de 6,40 – 6,50 (Ozturkoglu-Budak et al., 2017; Mietton et al., 2018). L'affinage de ces fromages bleus se fait à faible température et haute humidité durant au moins trois mois (Ozturkoglu-Budak et al., 2017).



### b) Les pâtes pressées non cuites

Parmi les fromages à pâte pressée non cuite ( $T^{\circ} < 40^{\circ}\text{C}$  tout au long du procédé), trois sous familles se distinguent : les souples (ex. : Reblochon), les fermes (ex. : Gouda) et les caillés broyés (ex. : Cheddar).

Le Reblochon est un fromage français pressé durant 1h à 1h30 (pression  $< 20 - 30\text{ g/cm}^2$ ) (Mietton et al., 2018). L'affinage se déroule à une humidité relative de 90 %, durant 35 à 42 jours à  $15^{\circ}\text{C}$  (Mounier et al., 2017).

Le Gouda est originaire des Pays-Bas. Après chauffage jusqu'à  $36 - 38^{\circ}\text{C}$  et délactosage, les caillebottes sont pressées (pression de  $100$  à  $200\text{ g/cm}^2$  durant 2 à 6h) avant moulage et salage en saumure (Mietton et al., 2018). L'affinage du Gouda se déroule à  $12^{\circ}\text{C} - 14^{\circ}\text{C}$  dans un local ayant une humidité relative de 90 %. La durée est de minimum 6 semaines (Goudédranche et al., 2017b).

La différence entre les pâtes pressées non cuites souples et fermes réside donc dans les paramètres de pressage.

Pour le Cheddar, l'emprésurage se fait à  $30 - 33^{\circ}\text{C}$  et débute à un pH de 6,60 pour finir à 5,30 (Goudédranche et al., 2017b; McSweeney et al., 2017; Mietton et al., 2018). Après l'égouttage en cuve, le caillé est transféré dans un bac de cheddarrisation où il continue son acidification et égouttage (Mietton et al., 2018). Les blocs de caillés sont retournés et empilés régulièrement (Everett et al., 2017). Le caillé est alors broyé en cossettes, salé pour atteindre une teneur de 2,0 à 2,5 % de sel, et malaxé durant 20 minutes (Mietton et al., 2018). Après la mise en moule, le caillé est fortement pressé ( $1,50$  à  $2\text{ kg/cm}^2$  durant 6 à 12h) pour souder ces cossettes (Goudédranche et al., 2017b; Mietton et al., 2018). La durée de l'affinage ainsi que sa température varient selon le degré de maturité souhaité. En général, le local est à  $4 - 8^{\circ}\text{C}$  (parfois la température peut être de  $14^{\circ}\text{C}$ ) et le Cheddar mature durant 3 mois à 2 ans (McSweeney et al., 2017).

### c) Les pâtes pressées mi-cuites

Deux sous-familles de pâtes pressées mi-cuites peuvent être différenciées : les mi-cuites aveugles (ex. : Abondance) et les mi-cuites à ouvertures (ex. : Appenzel). L'étape de chauffage du caillé est effectuée à  $40 - 50^{\circ}\text{C}$ . (Mietton et al., 2018). Le pH d'emprésurage est environ à 6,60 – 6,70 et celui au démoulage est d'environ 5,20. L'affinage du fromage Abondance dure de 6 mois à 1 an, et minimum 3 mois pour l'Appenzel (Mietton et al., 2018).

### d) Les pâtes pressées cuites

Parmi les pâtes pressées cuites, il faut distinguer celles sans trous, également appelés « yeux », (ex. : Parmesan), ou avec « yeux » (ex. : Emmental). La formation des « yeux » résulte de l'activité de certaines bactéries d'affinage (ex. : *Propionibacterium freudenreichii* pour la production de l'Emmental) (Gagnaire et al., 2018). Le caillé est chauffé à une température égale ou supérieure à  $50^{\circ}\text{C}$ , le pH d'emprésurage est de 6,40 – 6,45 dans le cas du Parmesan et de 6,55 - 6,65 dans le cas de l'Emmental (Ardö et al., 2017). La durée de l'affinage varie selon le fromage : dans le cas de l'Emmental, elle est de 1,5 à 3 mois ou plus pour permettre la formation d'yeux suite à l'activité enzymatique, tandis que pour le

Parmesan, elle est de minimum 12 mois jusqu'à 18 mois et plus (Cotter et al., 2017; McSweeney et al., 2017; Mietton et al., 2018).

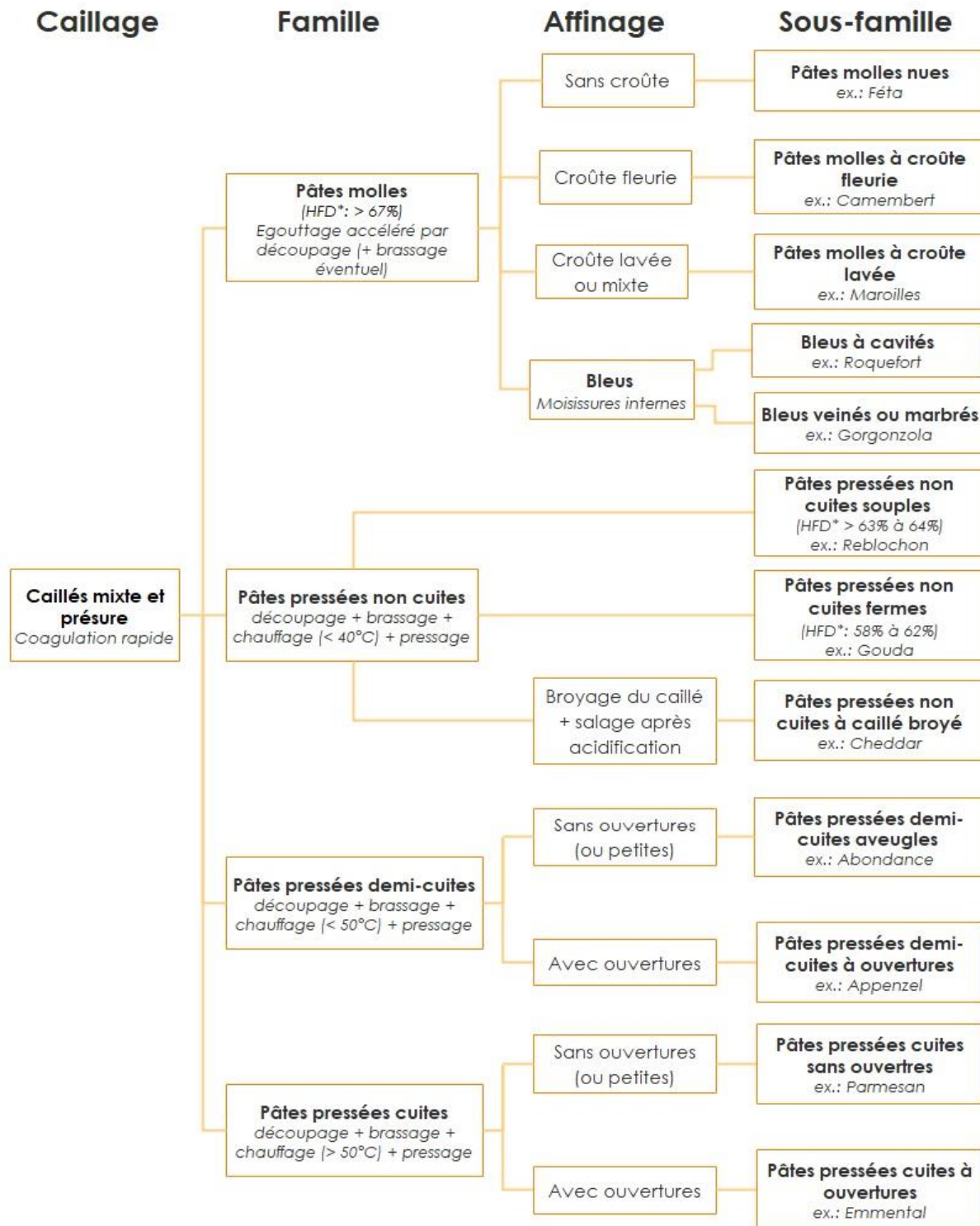


Figure 3: Les familles des fromages à partir d'un caillé mixte (HFD\* : Taux d'humidité dans le fromage dégraissé) (Profession fromager, © Edition ADS, 2016).

## 1.3. Microflore du fromage

La flore bactérienne présente au sein des fromages peut être originaire du lait de départ, de l'équipement et environnement de production ou provenir de l'ajout de ferments lactiques en cours de fabrication (Ozturkoglu-Budak et al., 2017; Pyz-Łukasik et al., 2018). Les points suivants décriront l'environnement bactérien présent dans le lait suivi des micro-organismes spécifiques du fromage. Enfin, l'approche métagénomique appliquée aux fromages sera également expliquée.

### 1.3.1. Bactéries

Différents micro-organismes participent à la texture et à la structure du fromage, incluant des bactéries non lactiques, des levures, et des moisissures (Parente et al., 2017).

Parmi ces micro-organismes, certains sont volontairement apportés par le fromager. Il s'agit des ferments d'affinage. Bien que généralement ajoutés en début de fabrication, les micro-organismes d'affinage n'interviennent pas dans l'acidification en cours de caillage et d'égouttage. Leur activité débute pendant l'affinage. Ils produisent en effet des composés biochimiques et organoleptiques ayant un impact sur la texture, la structure et la saveur du produit fini (Parente et al., 2017).

Parmi les bactéries majeures intervenant durant l'affinage figurent *Corynebacterium*, *Propionibacterium* spp ou encore *Brevibacterium linens* (bactérie rouge caractéristique de la croûte de certains fromages).

Les bactéries du genre *Corynebacterium* sont Gram + et anaérobies facultatives (Irlinger et al., 2017). Ce genre bactérien se retrouve principalement à la surface des fromages (Ceugniet et al., 2017; Irlinger et al., 2017). *C. casei* et *C. variable* sont deux espèces présentes en duo au sein des fromages (Desmasures et al., 2018). Elles ont la capacité de métaboliser le lactate. De plus, *C. variable* produit différents composés, par exemple l'acétoïne, le butanediol ou le méthane-thiol, participant aux arômes de la croûte des fromages à croûte lavée (Irlinger et al., 2017).

Les bactéries propioniques, telles que *Propionibacterium* spp, sont des actinobactéries, Gram +, non mobiles et non sporulantes (Irlinger et al., 2017). Elles sont anaérobies ou aérotolérantes, mésophiles, mais il est possible que certaines espèces du genre croissent à des températures inférieures à 3 °C (Desmasures et al., 2018). Pour une croissance optimale de ces bactéries, le pH doit être compris 6,50 et 7,00 (Desmasures et al., 2018). Les bactéries propioniques transforment le lactate en propionate, acétate et acide carbonique (Hayaloglu, 2016). Elles sont donc responsables de la formation des yeux durant l'affinage de certains fromages (ex : Emmental ou Gouda) (Hayaloglu, 2016; Irlinger et al., 2017). De plus, l'espèce *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* apporte un goût de noisette aux fromages (Hayaloglu, 2016; Fröhlich-Wyder et al., 2017).

Parmi les bactéries non lactiques utilisées dans la production de fromage figure *Brevibacterium linens*, également appelée « ferment rouge » (Leclercq-Perlat et al., 2004; Cogan, 2011). *B. linens* est aérobie strict et halotolérante. Sa température optimale de

croissance est de 20 – 30 °C, avec un pH optimal de 6,50 – 6,80 (Mounier et al., 2017). Elle est associée à la couleur jaune-orange observée à la surface de certains fromages après affinage (Leclercq-Perlat et al., 2004; Cogan, 2011; PEF-AgroAlimentaire, 2014). En effet, cette bactérie est capable de produire des pigments caroténoïdes ayant un large panel de couleurs selon l'exposition à la lumière et les conditions de croissance (Mounier et al., 2017). De plus, elle produit des enzymes telles que des protéinases, peptidases et lipases, et est impliquée dans l'apport d'arômes et de textures aux fromages (Ratray et al., 1999; Cogan, 2011). Elle est également capable de produire des bactériocines inhibant la croissance de *L. monocytogenes* (Cogan, 2011; Masoud et al., 2012).

### 1.3.2. Levures et moisissures

Deux types de champignons, et donc d'eucaryotes, sont également rencontrés dans les fromages : les levures et les moisissures. *Candida*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, ou encore *Pichia*, figurent parmi les genres levuriens retrouvés dans le fromage. Concernant les moisissures, les genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* et *Fusarium* ont par exemple été observés (O'Sullivan et al., 2017). Leur présence a des effets bénéfiques lors de la production de fromage. Par exemple, en début d'affinage, les levures désacidifient la surface de celui-ci, ce qui favorise la croissance de bactéries Gram + propres à la surface du fromage (McSweeney, 2017). Les espèces *Geotrichum candidum*, *Penicillium candidum*, et *Penicillium roqueforti* font parties des principales dans les fromages à moisissures (Desmasures, 2014). Elles possèdent un rôle de dégradation des constituants du lait, permettant le développement d'arômes et de texture (Desmasures, 2014).

*G. candidum* est une espèce de levure présente au sein du lait cru et, par conséquent, dans les fromages à base de lait cru (Boutrou et al., 2005). Elle participe au développement des fromages à croûte lavée, à croûte fleurie, et à pâte pressée (Boutrou et al., 2005, 2006; Desmasures, 2014). Dans le cas des fromages à croûte lavée, cette espèce influence l'arôme de ces produits ainsi que la texture de la morge (Eliskases-Lechner et al., 2011). Cependant, une croissance excessive de *G. candidum* peut provoquer une surface trop lisse et des arômes non désirés (Eliskases-Lechner et al., 2011; Botha et al., 2014).

*Penicillium roqueforti* est utilisé dans le cas des fromages à moisissures internes, dits bleus ou pâtes persillées, tels que le Roquefort, le Stilton ou le Gorgonzola (Desmasures, 2014; Hayaloglu, 2016; Khattab et al., 2019). Cette espèce produit des mélanines bleu-vertes dans ses spores et son mycélium, ce qui intensifie la couleur bleue du fromage (Desmasures, 2014; Frisvad, 2014; Fox & McSweeney, 2017). Elle a la capacité de se développer dans un environnement faible en oxygène, en comparaison aux autres moisissures. En effet, lors de la production de fromages bleus, ceux-ci doivent être percés afin de permettre la diffusion de l'oxygène au sein du produit pour favoriser le développement de la moisissure (Hayaloglu, 2016; Jackson et al., 2016a; Gassi et al., 2017).

*Penicillium candidum* et *Penicillium camemberti* sont des moisissures qui se développent à la surface du fromage après *G. candidum* (Boutrou et al., 2006). Elles sont utilisées dans la production de fromage de type Camembert et Brie (Desmasures, 2014; Jackson et al., 2016b). Le développement excessif de *P. camemberti* peut amener au

fromage un goût amer prononcé indésirable (Eliskases-Lechner et al., 2011; Desmasure, 2014). La texture crémeuse du Camembert est apportée grâce à l'activité réactionnelle de *P. camemberti*. Dans le cas du Brie, *P. candidum* remplit ce rôle. Cependant, dû à des différences dans l'affinage, la croûte blanche formée par la moisissure au début de l'affinage deviendra jaune (Frisvad, 2014; Jackson et al., 2016b).

## 1.4. L'approche métagénétique

Il est important de différencier la métagénomique et la métagénétique. En effet, ces deux techniques reposent sur un principe similaire mais se différencient par leur spécificité. Dans le cas d'une communauté bactérienne, la métagénomique étudie la communauté via le séquençage de l'ensemble de l'ADN bactérien extrait du milieu. La métagénétique est une approche plus ciblée, basée sur l'amplification spécifique d'un gène spécifique, et sur son séquençage (Diene et al., 2014). Une étude métagénétique représente donc une analyse à grande échelle de la biodiversité, au travers de l'amplification et du séquençage de gènes homologues (Carugati et al., 2015).

Dans le domaine alimentaire, le gène le plus souvent étudié est celui codant pour l'ARN ribosomique 16s. Celui-ci a l'avantage d'être un repère puissant dans l'identification des espèces bactériennes et l'étude phylogénétique et taxonomique d'un milieu (Janda et al., 2007; Kergourlay et al., 2015). Ce gène, long de 1500 paires de bases, contient neuf régions variables intercalées entre des régions fortement conservées (Figure 4) (Chakravorty et al., 2007).

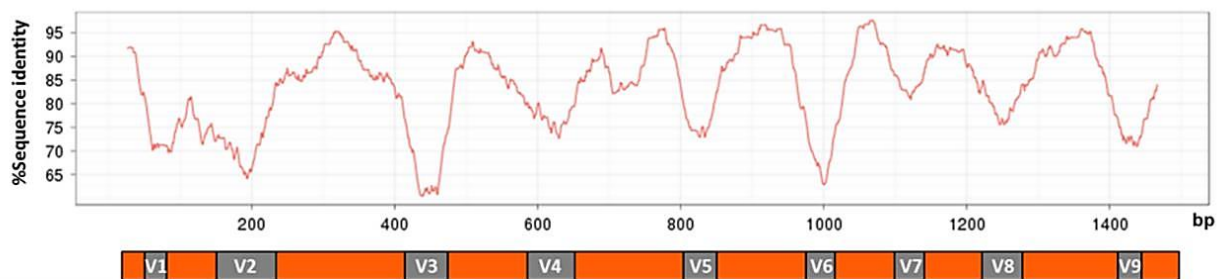


Figure 4: Graphique du % d'identité de séquence selon les régions variables et conservées du gène 16S rRNA (Schutz, juin-5-2019).

Le séquençage par la technologie MiSeq d'Illumina de l'ADN extrait et amplifié, utilisé dans le cadre de cette étude, est suivi d'un alignement des séquences obtenues, en comparaison avec une base de données de référence, permettant ainsi l'identification des espèces rencontrées (Lortal et al., 2018).

Dans le domaine du fromage, différentes études métagénétiques ont été publiées ces dernières années. Douze fromages français différents ont été étudiés, et 76 unités taxonomiques opérationnelles (OTU) bactériennes ont été identifiées avec une différence entre la croûte et le cœur des fromages. De plus, dans le cas de la Tomme d'Orchies ou du Herve, 207 phylotypes ont été découverts parmi les fromages à base de lait cru ou pasteurisé (Delcenserie et al., 2014).

Les principaux phyla bactériens observés dans les fromages étudiés sont *Firmicutes*, *Actinobacteria* et *Proteobacteria* (Frétin et al., 2018). Les études ont différencié les communautés bactériennes de la croûte et du cœur des fromages.

Parmi les *Firmicutes*, plusieurs genres sont fréquemment présents au sein des fromages au lait cru ou pasteurisé. Les principaux genres dans le cœur et la croûte des fromages sont *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Staphylococcus*. Les trois premiers font partie des bactéries lactiques utilisées lors du caillage (Dugat-Bony et al., 2016). Ces genres bactériens ont été détectés dans différents fromages repris dans le Tableau 2.

Parmi les *Actinobacteria*, en plus d'être présent dans les fromages dans le Tableau 2, le genre *Corynebacterium* a également été repéré dans la croûte de différents fromages artisanaux (mous, mi-durs et durs (Quigley et al., 2012a). Ces bactéries Corynéformes influencent le développement des saveurs de la croûte de fromage ainsi que la couleur de celle-ci (Quigley et al., 2012b; Fox, Cogan, et al., 2017).

Enfin, dans le phylum des *Proteobacteria* figure principalement le genre *Psychrobacter* (Tableau 2). Principalement détecté dans la croûte des fromages, il pourrait avoir un rôle dans l'apport des saveurs (Quigley et al., 2012b).

**Tableau 2: Genres bactériens présents dans différents fromages (C\*: Cru, Pa\*: Pasteurisé).**

| Phylum                | Genre                  | Herve (cœur et croûte, C* et Pa*) | Tomme d'Orchies (C* & Pa*) | Gruyère (C*) | Jarlsberg (C*) | Gruyère (C*) | Cheddar (C*) | Brie (P*) |
|-----------------------|------------------------|-----------------------------------|----------------------------|--------------|----------------|--------------|--------------|-----------|
| <b>Firmicutes</b>     | <i>Lactococcus</i>     | x                                 | x                          | x            | x              | x            | x            |           |
|                       | <i>Lactobacillus</i>   |                                   |                            |              | x              | x            | x            |           |
|                       | <i>Streptococcus</i>   |                                   | x                          | x            | x              |              |              | x         |
|                       | <i>Staphylococcus</i>  | x                                 |                            |              |                | x            |              | x         |
| <b>Actinobacteria</b> | <i>Corynebacterium</i> | x                                 | x                          |              |                |              |              |           |
|                       | <i>Brevibacterium</i>  |                                   |                            | x            |                |              |              |           |
| <b>Proteobacteria</b> | <i>Psychrobacter</i>   | x                                 |                            |              |                |              |              | x         |



## 1.5. Micro-organismes d'altération et pathogéniques du lait et du fromage

Différents micro-organismes sont à l'origine de l'altération du lait cru et de ses produits dérivés, et peuvent constituer un risque pour la santé du consommateur (Perin et al., 2019). Leur présence réduit la durée de conservation et la stabilité du produit (O'Callaghan et al., 2019). Certains peuvent être pathogènes pour l'homme (Perin et al., 2019). Parmi ces micro-organismes figurent : *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* producteurs de vérocytotoxines (VTEC parmi lesquels *E. coli* O157:H7, et les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC), *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* et *Coxiella burnetii* (DiversiFerm, 2014; AFSCA, 2015). Les paragraphes suivants détailleront les cinq premiers micro-organismes. Ils figurent parmi les micro-organismes potentiellement transmissibles par l'ingestion de fromage (AFSCA, 2015).

Le Tableau 3 décrit les limites auxquelles doivent se soumettre les fromages, pour les micro-organismes pathogènes et les molécules suivantes : *L. monocytogenes*, *Salmonella*, enterotoxines staphylococciques.

Tableau 3: Critères de sécurité des denrées alimentaires (AFSCA, 2015).

| Catégorie de denrées alimentaires  | Micro-organisme               | Limite                         | Stade d'application du critère   |
|--|-------------------------------|--------------------------------|--|
| Denrées alimentaires prêtes à être consommées permettant le développement de <i>L. monocytogenes</i> , autres que celles destinées ou à des fins médicales spéciales                     | <i>Listeria monocytogenes</i> | 100 ufc/g <sup>a</sup>         | Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation                                      |
|  |                               | Absence dans 25 g <sup>b</sup> | Avant que la denrée alimentaire n'ait quitté le contrôle immédiat de l'opérateur qui l'a fabriquée |
| Denrées alimentaires prêtes à être consommées ne permettant pas le développement de <i>L. monocytogenes</i> , autres que celles destinées ou à des fins médicales spéciales <sup>c</sup> |                               | 100 ufc/g                      | Produit mis sur le marché pendant leur durée de conservation                                       |

|  |                                 |                            |   |
|--|---------------------------------|----------------------------|---|
| <b>Fromage, beurre et crème fabriqués à partir de lait cru ou de lait traité à une température inférieure à celle de la pasteurisation<sup>d</sup></b> | <i>Salmonella</i>               | Absence dans 25 g          | Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation |
| <b>Fromage au lait cru ou ayant subi un traitement thermique plus faible que la pasteurisation<sup>e</sup></b>   | Entérotoxines staphylococciques | Pas de détection dans 25 g | Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation |

<sup>a</sup> Ce critère est applicable lorsque le fabricant est en mesure de démontrer, à la satisfaction de l'autorité compétente, que le produit respectera la limite de 100 ufc/g pendant la durée de conservation. L'exploitant peut fixer, pendant le procédé, des valeurs intermédiaires suffisamment basses pour garantir que la limite de 100 ufc/g ne sera pas dépassée au terme de la durée de conservation.

<sup>b</sup> Ce critère est applicable aux produits avant qu'ils ne quittent le contrôle immédiat de l'exploitant du secteur alimentaire, lorsque celui-ci n'est pas en mesure de démontrer, à la satisfaction de l'autorité compétente, que le produit respectera la limite de 100 ufc/g pendant toute la durée de conservation.

<sup>c</sup> Les produits pour lesquels  $\text{pH} \leq 4,4$  ou  $a_w \leq 0,92$ , les produits pour lesquels  $\text{pH} \leq 5,0$  et  $a_w \leq 0,94$ , les produits à durée de conservation inférieure à cinq jours appartiennent automatiquement à cette catégorie. D'autres catégories de produits peuvent aussi appartenir à cette catégorie, sous réserve d'une justification scientifique.

<sup>d</sup> Excepté les produits pour lesquels le fabricant peut démontrer, à la satisfaction des autorités compétentes, qu'en raison du temps d'affinage et de la valeur  $a_w$  du produit, il n'y a aucun risque de contamination par les salmonelles.

<sup>e</sup> Lorsque des valeurs de staphylocoques à coagulase positive  $> 105$  ufc/g sont détectées, le lot de fromages doit faire l'objet d'une recherche des entérotoxines staphylococciques (voir critères d'hygiène des procédés).

### 1.5.1. *Salmonella* spp.

Les *Salmonella* spp. sont des bactéries Gram - en forme de bâtonnets, anaérobies facultatives, appartenant à la famille des Enterobacteriaceae (Crump et al., 2017; Panthi et al., 2017; Holschbach et al., 2018). Au sein de deux espèces, *Salmonella bongori* et *Salmonella enterica*, des centaines de sérotypes différents ont été découverts. Les salmonelles peuvent se développer dans des environnements acides. Une croissance à pH 3,7 a par exemple été rapportée. Cependant d'autres facteurs peuvent influencer celle-ci, tels que la température, l'oxygène disponible, le milieu de croissance, le taux d'inoculation et le sérotype (J. D'Amico et al., 2017).

Les bactéries du genre *Salmonella* sont à l'origine de la salmonellose, une maladie se transmettant principalement par voie fécale au sein des ruminants et responsable de toxico-infections liées à la consommation d'aliments ou d'eau contaminés. Cette contamination est également possible suite à un contact avec l'animal contaminé ou avec son environnement. Certaines souches de salmonelles causent des mammites et par



conséquent, les micro-organismes pathogènes peuvent se retrouver dans le lait (Crump et al., 2017; J. D'Amico et al., 2017; Holschbach et al., 2018; FAO, mars-19-2019).

Les personnes contaminées par ce micro-organisme pathogène peuvent présenter les symptômes suivants : diarrhée, forte fièvre accompagnée de frissons et maux de tête, douleurs abdominales, vomissements (Santé Publique, 2018).

### 1.5.2. *Staphylococcus aureus*

Un autre micro-organisme pathogène rencontré dans le lait est *Staphylococcus aureus*. Cette bactérie coagulase-positif produit des toxines responsables de l'intoxication alimentaire staphylococcique (Sugrue et al., 2019). Par exemple, en ce qui concerne les produits laitiers, la toxine produite est l'entérotoxine staphylococcique C (SEC) (FAO/OMS, 2005). Cette bactérie peut causer des mammites chez les animaux en lactation. Toutes les souches de *S. aureus* n'ont pas la capacité de produire des toxines. Différents paramètres physico-chimiques peuvent influencer la production de toxine, tels que le pH, la température et la concentration en sels (Panthi et al., 2017).

La contamination par *S. aureus* provoque chez l'homme des nausées, des vomissements incoercibles, des douleurs abdominales, des diarrhées, des vertiges, des frissons, et une faiblesse généralement accompagnée d'une fièvre modérée (Santé Publique, 2018).

### 1.5.3. *Escherichia coli*

Une bactérie Gram-, anaérobie facultative et figurant dans la flore microbienne humaine, *E. coli*, est un indicateur de contamination fécale et de conditions hygiéniques pauvres (Sugrue et al., 2019). Tout comme pour *S. aureus*, toutes les souches d'*E. coli* ne sont pas pathogènes. Certaines souches d'*E. coli* sont capables de produire des Shiga-toxines (STEC), provoquant une grave maladie (OMS, mai-27-2019). Certaines souches peuvent résister à des températures de réfrigération. Par exemple, *E. coli* O157:H7 peut croître à des températures proches de 7 °C dans le lait et est le sérotype le plus important d'un point de vue santé publique (OMS, 2018a).

Les symptômes dus à l'infection par les STEC/VTEC sont des crampes abdominales, des diarrhées (parfois sanglantes), de la fièvre et des vomissements (OMS, 2018a; Santé Publique, 2018). *E. coli* O157:H7 se transmet à l'homme par des aliments contaminés, tels que le lait cru (OMS, 2018a; Santé Publique, 2018).

### 1.5.4. *Campylobacter* spp.

Un autre micro-organisme pathogène peut également être présent au sein des produits laitiers à base de lait cru : *Campylobacter* (DiversiFerm, 2014). Ce genre bactérien est à l'origine d'une gastroentérite qui touche l'Homme mondialement. Il s'agit d'une bactérie Gram -, de forme spiralée ou incurvée. Il comporte une vingtaine d'espèces (ANSES, 2011a). L'espèce la plus répandue parmi les micro-organismes pathogènes est *Campylobacter jejuni* (Ozturkoglu-Budak et al., 2017). Cette dernière figure parmi une vingtaine du genre à avoir la capacité d'être thermotolérantes (T° optimale = 41,5 °C). La

transmission à l'Homme est indirecte, suite à une consommation d'aliments contaminés (ex. : volaille, viande de bœuf ou de porc peu ou mal cuites, lait cru et eau contaminée) (ANSES, 2011a; Santé Publique, 2018). Cette bactérie est à l'origine de la campylobactériose, responsable de diarrhées, de douleurs abdominales, de fièvres, de céphalées, et de nausées et/ou vomissements (OMS, 2018b).

### 1.5.5. *Listeria monocytogenes*

Le genre *Listeria* comporte huit espèces, dont *Listeria monocytogenes*, une bactérie pathogène pour l'Homme et les animaux, Gram +, sous forme de bâtonnets. Elle est responsable de la toxi-infection appelée listériose. Elle résiste à des conditions de pH entre 4,30 et 9,40, et peut vivre jusqu'à une  $a_w$  aussi faible que 0,92. De plus, cette bactérie psychrotrophe a la capacité de se développer à des températures basses, sous 7 °C (ANSES, 2011b; Chatelard-Chauvin et al., 2015; Lakicevic et al., 2017; Akrami-Mohajeri et al., 2018; Gérard et al., 2018). À cause de sa résistance aux conditions extrêmes, ce pathogène peut survivre durant la conservation du produit au réfrigérateur. C'est pourquoi, malgré le respect de la chaîne du froid lors de la production et de la conservation d'aliments, il est possible de conserver des traces de *L. monocytogenes*. Différentes sources de contamination sont possibles. La contamination peut être due à l'animal ou à l'environnement de production. Le traitement thermique permettant l'élimination de ce pathogène doit se faire à une température de minimum 65°C (ANSES, 2011b).

Les symptômes de la listériose sont la diarrhée, le vomissement, la fièvre, les maux de tête, les convulsions, les frissons, ou encore la gastroentérite et la myalgie. Elle peut également mener à la méningite et la septicémie (Akrami-Mohajeri et al., 2018).

## 1.6. Risques microbiologiques liés à la consommation de fromages au lait cru

En 2017 dans l'Union européenne, 2,2 % des toxi-infections alimentaires collectives signalées sont dues à la consommation de fromage (EFSA et al., 2018). Plusieurs micro-organismes pathogènes en sont à l'origine, dont principalement : *Salmonella* spp, *S. aureus*, *Campylobacter* spp, *E. coli* et *L. monocytogenes* (DiversiFerm, 2014; Yoon et al., 2016).

En général, le niveau de risque d'une contamination bactérienne est élevé (Michelet, 2012). Plusieurs cas d'infection ont été rapportés dans la littérature.

En 2016, dans l'Union européenne, 94.530 cas humains de salmonelloses ont été rapportés. Par rapport à 2014, ceci représente une augmentation de 3 %. Les foyers épidémiques à cause de *Salmonella* sont en hausses dues à *S. enteritidis* : un foyer sur six a été sujet d'une toxi-infection alimentaire en 2016 (EFSA, 2017). Mais le risque au sein des produits laitiers est faible (0,1 % de détection sur plus de 25.000 échantillons testés) par rapport à celui lié à la consommation de produits à base d'œufs et de volaille (DiversiFerm, 2014; EFSA, 2017).

*S. aureus* est l'agent responsable de mammite le plus fréquent en comparaison avec *L. monocytogenes*, *Salmonella* et *E. coli*, qui sont plus rares (DiversiFerm, 2014). *S. aureus* est souvent détectée dans les produits à base de lait cru, mais la probabilité de production d'entérotoxines par les souches varie (AFSCA, 2015). En 2017, six états membres et deux états non-membres de l'UE ont notifiés la présence de *S. aureus* dans différents animaux et produits alimentaires (EFSA et al., 2018).

L'infection par *E. coli* producteur de Shiga-toxine peut évoluer en syndrome hémolytique et urémique (SHU) pour jusqu'à 10 % des patients, avec une taux de mortalité de 3 à 5 % (O'Sullivan et al., 2017; OMS, 2018a). En 2005, 3314 personnes ont été affectées par cette bactérie, avec une atteinte grave chez les enfants (EFSA, 2006). Entre 1998 et 2011 aux États Unis, 11 % des 38 cas d'infection liés à la consommation de fromages au lait cru ont été causé par *E. coli* (O'Sullivan et al., 2017).

La campylobactériose reste la maladie d'origine alimentaire la plus fréquemment signalée dans l'UE depuis 2005 (EFSA, 2015). *Campylobacter* a été signalé présent chez 246.307 personnes en 2016, ce qui représente une augmentation de 6,10 % par rapport à 2015. Cependant, le taux de mortalité est faible (0,03 %) (OMS, 2012). Suite à une étude sur la présence de *Campylobacter* au sein de produits laitiers, le résultat est de 1 % des 384 échantillons de présence (DiversiFerm, 2014).

Certaines catégories de personnes sont plus susceptibles d'être touchées par *L. monocytogenes*, tels que les personnes âgées, les enfants, les femmes enceintes et les individus immunodéprimés (Orsi et al., 2011; Lopez-Valladares et al., 2018). La listériose provoque une infection plus sévère : 97 % des patients issus de ces populations à risque sont hospitalisés suite à la contamination. Cette maladie augmente continuellement : entre 2013 et 2014, une augmentation de 13 % a été observée (EFSA, 2015). En 2016, 2536 cas ont été déclarés et 247 décès signalés. Les personnes âgées (> 64 ans) représentent une majorité de ces cas. En ce qui concerne les fromages (pâtes molles et mi-molles), 1,4 % des 3.990 résultats ont été positifs pour le test de détection dans 25 g (DiversiFerm, 2014). En 2015, en Europe, la listériose a touché environ 2200 personnes dont 270 en sont mortes (Lopez-Valladares et al., 2018).

## 2. Objectifs

---

L'objectif principal du travail était d'étudier et de caractériser d'un point de vue écologique la communauté bactérienne présente au sein des fromages fermiers, à la sortie de production. Cette dernière a été étudiée par métagénomique. Pour ce faire, l'ADN présent au sein des fromages fermiers a été extrait, et le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S a été séquencé. Cette étude à grande échelle est la première du genre en Belgique. Les résultats obtenus pourraient permettre d'améliorer la maîtrise des bactéries pathogènes dans les fromages fermiers, fournissant ainsi des pistes pour renforcer la sécurité alimentaire de ces produits réputés. Après identification des OTUs, les genres bactériens ont été classés en fonction des types de fromage ainsi que des types de lait utilisé. Enfin, l'environnement bactérien a été comparé entre fromages au lait cru et au lait pasteurisé.

Au préalable, un objectif secondaire a été d'évaluer les caractéristiques physico-chimiques de ces fromages artisanaux belges. Ces données sont essentielles, car elles permettront de comprendre la présence ou l'absence de certains micro-organismes au sein des fromages étudiés.

Un autre objectif du travail était de comparer les microflore résultant de différentes technologies fromagères (fromages frais, à pâte molle, et à pâte pressée), de produits fabriqués à partir de différents types de lait (cru ou pasteurisé, lait de vache, de chèvre ou de brebis).

## 3. Matériel et méthodes

### 3.1. Echantillonnage

L'étude a porté sur 32 échantillons de fromages fermiers belges analysés en triplicat (trois pièces issues d'un même lot). Les échantillons de fromages fermiers étudiés ont été prélevés directement après leur production, c'est-à-dire après égouttage ou après affinage, respectivement pour les fromages frais et affinés. Ils ont donc été nommés les « échantillons J0 ». Ils ont tous été produits entre 2018 et 2019 et sont issus de fermes couvrant l'ensemble du territoire national.

Certains étaient à base de lait pasteurisé ( $n = 6$ ). D'autres étaient à base de lait cru ( $n = 26$ ), et des laits de différentes origines animales ont aussi été utilisés (Tableau 4).

**Tableau 4: Tableau récapitulatif relatif aux fromages analysés (Origine du lait, type de lait, types de fromages).**

| Variables        | Modalités    | Nombre |
|------------------|--------------|--------|
| Origine du lait  | Vache        | 20     |
|                  | Chèvre       | 3      |
|                  | Brebis       | 3      |
| Type de lait     | Cru          | 21     |
|                  | Pasteurisé   | 5      |
| Types de fromage | Frais        | 7      |
|                  | Pâte pressée | 12     |
|                  | Pâte molle   | 7      |

Pour chaque échantillon, 25 g ont été mis en suspension dans un tampon citrate (20 % m/v de citrate de trisodium dihydraté). L'homogénéisation a été faite à l'aide de l'Ultra Turrax® (IKA ULTRA-TURRAX T18 digital, Allemagne) : deux fois 2 minutes à 16 000 rpm avec 10 minutes de repos entre les deux homogénéisations. Ces suspensions ont été conservées à -80 °C avant leur utilisation. La matière première restante a été consacrée aux études physico-chimiques.

### 3.2. Étude physico-chimique

Différents paramètres physico-chimiques ont été déterminés sur les échantillons de fromage : le pH, l' $a_w$ , la matière sèche, la teneur en sel, et la teneur en matière grasse.

Le pH a été mesuré via une électrode InLab Surface Pro-ISM (Mettler Toledo, Columbus, USA). Ce paramètre a été mesuré au cœur des fromages.

L' $a_w$  a été déterminée par la méthode du miroir à point de rosée (Aqualab 4TE Water Activity Meter, Decagon Devices Inc., Pullman WA, USA). Cette méthode donne une valeur avec une précision de  $\pm 0,003$ . Les fromages affinés présentent un gradient d' $a_w$  de

la surface jusqu'au cœur. Il a été décidé de ne mesurer l' $a_w$  qu'au cœur des produits. En effet, après consultation d'un expert néerlandophone en physico-chimie alimentaire, il était plus judicieux de tenir compte uniquement du cœur des produits.

La matière sèche a été mesurée en suivant la méthode détaillée par l'ISO 5534. Une masse exactement connue du produit humide a été mise dans une capsule et placée à l'étuve. Les poids avant et après séchage jusqu'à poids constant ont été mesurés à l'aide d'une balance analytique. La teneur en matière sèche a été définie comme étant le rapport entre la différence de masse entre le poids humide et sec du produit et la masse du produit humide, exprimée en pourcentage.

La teneur en sel a été obtenue par la détermination de la teneur en chlorures selon la méthode de titrage potentiométrique détaillée par l'ISO 5943. Après la mise en suspension d'une masse connue de fromage, la solution a été acidifiée par l'acide nitrique suivie du titrage potentiométrique des ions chlorure avec une solution titrée de nitrate d'argent. La teneur en chlorure de sodium a été calculée comme suit (exprimée en pourcentage en masse) :

$$\frac{(V1 - V0) * c * f}{m}$$

Avec :

V0 : volume (ml) de la solution titrée de nitrate d'argent, utilisé pour l'essai à blanc ;

V1 : volume (ml) de la solution titrée de nitrate d'argent, utilisé pour la détermination ;

C : concentration réelle (n/L), de la solution titrée de nitrate d'argent ;

F : facteur permettant d'exprimer le résultat en pourcentage (5,84 pour exprimer en % de NaCl).

La teneur en matière grasse a été déterminée par méthode gravimétrique. Cette dernière a consisté en un traitement avec de l'acide chlorhydrique suivi d'une extraction avec l'éther de pétrole et de l'éther diéthylique.

### 3.3. Extraction ADN

Pour étudier la population microbienne présente au sein d'un fromage, la première étape a consisté en l'extraction de l'ADN génomique contenu dans le produit laitier via le kit FastDNA® Spin Kit utilisant la solution de lyse TC (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). Une comparaison de kit d'extraction d'ADN a été réalisée avant le choix définitif. La comparaison a été effectuée entre le kit EasyFast™ Dairy Extraction (Progenus, Gembloux, Belgique) et le FastDNA® Spin Kit. La décision est basée sur la quantification et la qualité de l'extrait d'ADN. Afin de libérer les organites de la membrane cellulaire, le fromage dispersé en solution a été mis en contact avec une solution de lyse et une bille en céramique, afin d'intensifier la destruction de la membrane cellulaire. Après concentration des débris cellulaires par centrifugation (Sigma, Osterode am Harz, Allemagne), l'ADN contenu dans le fromage se trouvait dans le surnageant. Celui-ci a été transféré dans une colonne avec un

volume de Binding Matrix identique. La présence de silice dans cette solution permet sa liaison avec le lysat. Après une première filtration sur membrane, la silice a été lavée à l'aide d'une solution diluée à l'éthanol (SEWS-M). Une centrifugation (Sigma, Osterode am Harz, Allemagne) sans ajout de solution a permis d'éliminer le surplus d'alcool contenu dans la silice. Ensuite, l'ADN a été élué dans une solution aqueuse après incubation à 55 °C durant 5 minutes. Le protocole détaillé est fourni avec le kit FastDNA® Spin Kit.

Certains points du protocole ont dû être adaptés aux échantillons de fromage. Le volume ajouté dans le « Spin™ filter » a ainsi été de 600 µl et le temps de centrifugation pour l'élution de l'ADN a été de 1 minute 45 secondes.

### 3.4. Quantification de l'ADN

Durant l'extraction de l'ADN, différents réactifs ont été utilisés. Une quantité résiduelle de composés chimiques pouvait donc être présente et interférer dans les mesures de concentration et de qualité d'ADN. Une méthode rapide qui permet de déterminer la concentration et la qualité d'un extrait est la spectrophotométrie dans l'UV visible. L'appareil utilisé est le NanoDrop ND 1000 Spectro (ThermoFisher, Wilmington, USA). À l'aide d'un petit volume (0,5 µl à 2 µl), l'appareil peut fournir des valeurs d'absorbance à différentes longueurs d'onde (230, 260 et 280 nm) en effectuant un balayage.

Deux longueurs d'onde mesurent la quantité de contaminants dus à des résidus non éliminés au cours des étapes de purification : 230 et 280 nm. En effet, les protéines, phénols et carbohydrates absorbent à ces deux longueurs d'onde. Les nucléotides absorbent à 260 nm. Cette absorption à 260 nm est due à la présence de fonction cyclique avec des doubles liaisons du ribose dans le cas de l'ADN (Reckhow, 2004). C'est pourquoi différents ratios donnent une indication de la qualité de l'extrait. A260/A280 indique ainsi la pureté de l'ADN ou l'ARN, tandis que le rapport A260/A230 donne une idée de la pureté des extraits. Ces rapports doivent être proches de 1,8 – 2,0 pour A260/A280 et de 2,0 – 2,2 pour A260/A230 afin d'être un extrait de qualité.

Le blanc avant utilisation de l'appareil a été fait avec de l'eau exempte de RNase. Le blanc avant la lecture des échantillons a quant à lui été fait via la solution d'élution DES fournie dans le kit d'extraction Fast DNA Spin (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA).

### 3.5. Préparation des bibliothèques pour le séquençage Illumina

L'étude métagénomique des échantillons de fromage se fait sur le gène codant pour l'ARN ribosomique 16s. Celui-ci est présent en plusieurs copies dans toutes les bactéries. Le protocole utilisé au cours de ce travail a ciblé les régions V1-V3. Il s'agit du protocole suggéré par Illumina (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation).

Après extraction de l'ADN des échantillons, les étapes suivantes ont eu pour objectif d'amplifier le gène d'intérêt et de le préparer pour être séquençé par la technologie Illumina (Figure 5). Une première PCR a eu lieu, nommée « Amplicon PCR ». Les amorces utilisées au cours de cette amplification étaient propres aux régions cibles V1-V3, et comprenaient les adaptateurs Illumina, respectivement représentés en brun et en jaune sur la Figure 5. Les séquences des amorces *forward* et *reverse* étaient respectivement 5'-GAGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3' et 5'-ACCGCGGCTGCTGGCAC-3' (Ngo et al., 2018). Après vérification sur gel d'agarose de la qualité des amplicons, le produit PCR a été purifié à l'aide de billes magnétiques, au moyen du kit AMPure XP beads kit (Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA). Cette étape a permis d'éliminer des réactifs tels que les amorces, les dNTP's résiduels, et la polymérase. En effet, ceux-ci auraient pu interférer lors des étapes suivantes d'amplification.

Une seconde PCR, appelée PCR Index, a été réalisée sur les produits purifiés. Les amorces utilisées étaient particulières : elles possédaient des queues flottantes, avec une séquence kappa et une séquence Index, respectivement représentées en rouge et en vert sur la Figure 5. Il existe une quarantaine d'index différents qui permettent de créer une carte d'identité propre à chaque échantillon, selon les combinaisons d'index utilisées. Le rôle de cette PCR n'était pas d'amplifier le gène mais d'insérer l'index aux fragments obtenus après la première PCR. Ainsi, le nombre de cycles effectués ( $n = 10$ ) était inférieur au nombre de cycles d'une amplification PCR traditionnelle (généralement  $n = 30$ ). Une seconde purification, similaire à celle décrite précédemment, a été effectuée.



Figure 5: Schéma explicatif de l'hybridation des amorces (fw et rv) avec les queues flottantes après la seconde PCR. Les couleurs ont différents rôles : Brun : Amorce des régions V1 – V3, jaune : Adaptateurs Illumina, rouge : séquence kappa, vert : Séquence Index.



Ensuite, les amplicons ont été quantifiés au Quant-IT PicoGreen (ThermoFisher Scientific ; Waltham, MA, USA), une molécule intercalante à l'ADN double brin. Au plus la concentration en amplicon est élevée, au plus cette molécule s'intercale, et au plus la concentration du PicoGreen est élevée. Après la détermination de la concentration de l'échantillon, chaque produit PCR a été dilué pour obtenir une concentration finale de l'ordre de 10 ng/μl. Une dernière quantification de chaque échantillon de la librairie a été effectuée par une qPCR en temps réel, via le KAPA SYBR® FAST qPCR Kit (KapaBiosystems ; Wilmington, MA, USA). Le Sybr Green, composé contenu dans ce kit, est un agent fluorescent permettant de connaître la concentration exacte de chaque index. Avant la normalisation, les échantillons ont été rassemblés (« pooling ») et séquencés sur un séquenceur MiSeq utilisant les réactifs V3 (Illumina ; San Diego, CA, USA).

### 3.6. Analyse Bio-informatique

L'interprétation des séquences a été effectuée à l'aide de MOTHUR v1.35 (<https://www.mothur.org>) pour l'alignement et le regroupement avec la base de données SILVA Bacteria (v1.28) (<https://www.arb-silva.de>). L'algorithme UCHIME (<https://www.drive5.com/uchime/>) a été utilisé pour la détection des chimères. En fin d'analyse, une table d'OTUs a été produite pour chaque échantillon, avec le nombre de *reads* obtenu par OTU. Un *read* correspond à une séquence assignée à un OTU donné (O'Sullivan et al., 2017).

L'analyse s'est déroulée en trois étapes. Dans un premier temps, les séquences ont subi un pré-traitement de préparation pour les ordonner. Pour cela, il a fallu nettoyer et aligner les *reads* sur une séquence de référence. Les chimères et séquences mal alignées doivent ensuite être éliminées. La deuxième étape a été de catégoriser (« binning ») les séquences selon leur similarité en OTU. Ce regroupement s'est basé sur une matrice de distance. Ainsi, des séquences distantes de moins de 0,03 ont été considérées comme un même OTU. Enfin, la troisième étape a consisté en l'attribution du chemin taxonomique propre à chaque OTU.

La biodiversité a été étudiée avec MOTHUR v1.35, au moyen de différents indices : richesse, indices de Shannon, de Simpson, Chao1. La biodiversité permet d'apprécier la richesse et la diversité de la population au sein d'un milieu (Ceugniet et al., 2017; Bissett et al., 2018). Pour la richesse de la population, le nombre d'OTUs observées et l'indice de Chao1 ont été les deux paramètres étudiés. En ce qui concerne la diversité de la population, l'indice de Shannon et l'indice Inverse de Simpson ont été déterminés. Le nombre d'OTUs observées au sein d'un milieu ou d'un échantillon permet de décrire la richesse en espèces (Spellerberg, 2008). L'indice de Chao1 estime le nombre d'espèces non observées à partir de celles observées une fois (Marcon, 2010). L'indice de Shannon donne une mesure de la biodiversité des espèces au sein du milieu ou de l'échantillon en tant que quantité d'information (Spellerberg, 2008). L'indice inverse de Simpson est la probabilité qu'un individu ( $p_i$ ) tiré au hasard n'appartienne pas à l'espèce  $i$  (Marcon, 2010).

La diversité  $\beta$  a été étudiée via l'analyse en composantes principales, à l'aide du programme RStudio® et du package FactoMineR. La diversité  $\beta$  permet de comparer des communautés bactériennes selon leur composition dans un écosystème (Kuczynski et al.,

2011; Peterlongo, 2016). L'analyse en composantes principales (ACP) a permis de comparer la biodiversité entre les groupes étudiés (Ngo et al., 2018).

### 3.7. Traitements statistiques

Les traitements statistiques relatifs à la diversité  $\alpha$  ont été effectués sur PRISM 5 (Graphpad Software; San Diego, CA, USA). Pour la diversité  $\beta$ , RStudio® a été le programme choisi.

La normalité des échantillons a été déterminée en premier lieu par le test statistique de Shapiro-Wilk ( $p$ -valeur  $< 0,05$ ). Celui-ci a permis de déterminer si la distribution des échantillons suivait une loi normale. Le résultat du test de normalité dicte le choix d'une méthode paramétrique ou non paramétrique pour l'étude des différences.

L'analyse en composantes principales (ACP), une technique descriptive, permet d'étudier les relations qui existent entre des variables quantitatives, sans tenir compte d'une quelconque structure, ni des variables, ni des individus (Palm, 2009). Cette analyse a pour but d'identifier les groupes d'individus (échantillons de fromages) communs selon les variables quantitatives. Dans le cas de cette étude, chaque OTU constitue une variable, le nombre de *reads* relatif à cette OTU au sein de chaque échantillon correspondant au trait quantitatif. L'ACP a été accomplie sur les résultats après avoir conservé les genres représentant plus de 0,01% des *reads* totaux. Deux genres se trouvant majoritairement présents, *Lactococcus* et *Streptococcus*, la même analyse a été réalisée en les masquant.

L'étude de la diversité  $\beta$  a été effectuée sur la table des OTUs obtenue après le traitement bio-informatique. Afin de déterminer si une différence significative entre les populations était présente au sein des types de fromages, type de lait et selon l'origine animale, une analyse moléculaire de la variance (AMOVA) a été effectuée (Mothur, juillet-22-2019a). Un second test statistique a permis d'étudier l'homogénéité au sein des populations, le test HOMOVA, correspondant à une analyse moléculaire sur l'homogénéité (Mothur, juillet-22-2019b).

## 4. Résultats et discussion

### 4.1. Étude physico-chimique

Le Tableau 5 décrit les valeurs de pH (au cœur du produit) et d' $a_w$  moyens avec les écarts-types pour chaque type de fromage. Au vu des écarts-types, la variabilité des pH et des  $a_w$  semble limitée, à l'exception de la gamme de pH des fromages à pâte molle.

Tableau 5: Les moyennes et écarts types de pH et d' $a_w$  selon le type de fromage des échantillons analysés.

| Type de fromage     | pH          | $a_w$       |
|---------------------|-------------|-------------|
| <b>Pâte molle</b>   | 5,63 ± 0,57 | 0,97 ± 0,01 |
| <b>Pâte pressée</b> | 5,74 ± 0,19 | 0,96 ± 0,01 |
| <b>Frais</b>        | 4,44 ± 0,16 | 0,99 ± 0,00 |

Les Figure 6 et Figure 7 représentent respectivement les pH et les  $a_w$  selon le type de fromage. Les conditions d'applications du test de comparaison de moyennes ont pu être satisfaites : les trois distributions suivaient une loi normale (test de normalité de Ryan-Joiner) et l'égalité des variances était respectée (test de Levene). Il a donc été possible de développer un modèle linéaire généralisé (GLM) pour chacun des deux paramètres étudiés. L'effectif variable en fonction des différentes familles technologiques a imposé le choix de cette méthode plutôt que celui de l'ANOVA, qui requiert des effectifs identiques entre les populations à comparer. Le GLM relatif aux valeurs de pH a mis en lumière des différences significatives (p-valeur < 0,001). Ce test ne spécifie malheureusement pas les populations entre lesquelles ces différences sont observées. Pour comprendre l'origine de ces différences, un test de Tukey a été réalisé, effectuant les comparaisons multiples en une unique étape. Ainsi, ces comparaisons entre familles technologiques ont démontré que seules les pâtes fraîches se différenciaient des autres fromages par un pH plus faible. Suite à un GLM et à une structuration des moyennes par la méthode de Tukey, il a pu être conclu que les  $a_w$  étaient significativement différentes entre les trois grandes familles technologiques (p-valeur < 0,001).

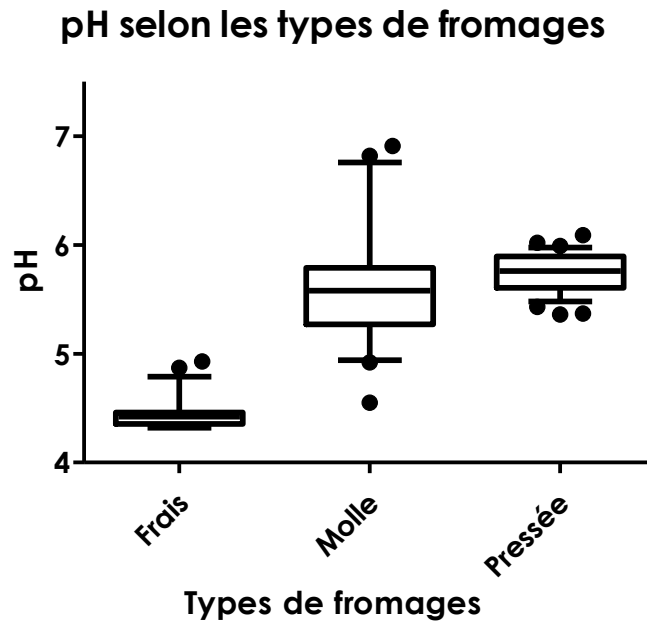


Figure 6: Boîtes à moustaches des pH selon le type de fromage à 10-90 percentiles.

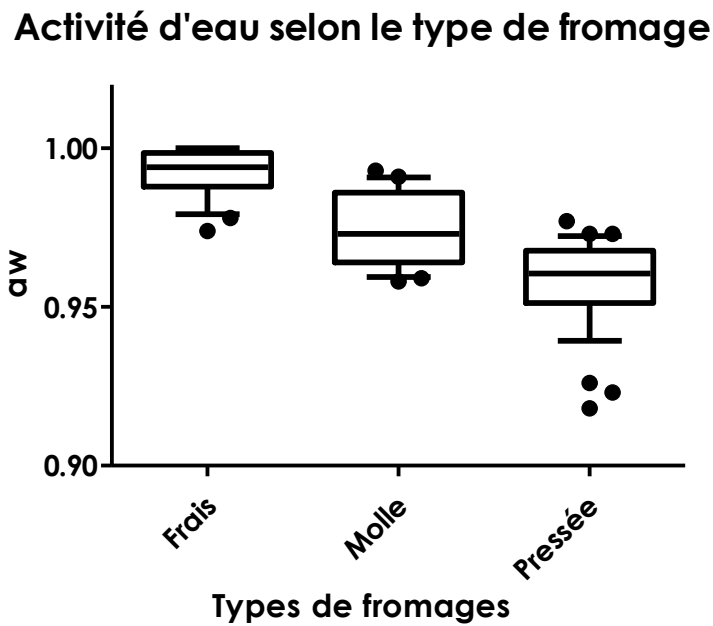


Figure 7: Boîtes à moustaches des activités d'eau selon le type de fromage à 10-90 percentiles.

Selon le Règlement (CE) N° 2073/2005, trois situations permettent d'affirmer que la bactérie pathogène *L. monocytogenes* ne peut se développer au sein d'un fromage :  $\text{pH} \leq 4,40$ ,  $a_w \leq 0,92$ , ou la combinaison de  $\text{pH} \leq 5$  et avec  $a_w \leq 0,94$ . Parmi les échantillons de fromages étudiés, quatre fromages frais avaient un pH inférieur à 4,40 et un fromage à pâte pressée présentait un  $a_w$  égale à 0,92. Ces cinq produits pourraient donc constituer un

milieu défavorable pour la croissance de *L. monocytogenes*, les produits restants pouvant donc constituer un risque pour le consommateur.

De manière générale, le pH des fromages frais, à pâte molle et à pâte pressée se situait entre 4,80 et 5,40, au cœur du produit (Kongo et al., 2016a). Plus précisément, les fromages fermiers belges présentaient les caractéristiques suivantes :  $4,16 \leq \text{pH} \leq 7,47$  et  $0,93 \leq a_w \leq 0,99$ . Il est important de distinguer le cœur et la croûte du fromage. La croûte est moins acide et donc plus favorable pour la prolifération des pathogènes. Par exemple, les pH du Castelo Branco au cœur et à la surface sont respectivement de 5,40 et 6,00 (Gérard et al., 2018). Le pH des fromages frais peut descendre jusqu'à 4,50 dans le Katiki, ou même atteindre une acidité aussi intense qu'un pH de 3,80 dans le Galotyri (Gobbetti et al., 2018). Leurs activités d'eau sont élevées également (Gérard et al., 2018). Les fromages à pâte pressée ont en général un pH situé entre 4,90 et 8,00 et une activité d'eau entre 0,91 et 0,97 (Gérard et al., 2018). Le Gouda, un fromage à pâte pressée, peut avoir un pH allant de 5,26 à 6,37 et une activité d'eau de 0,88 à 0,97 (sous la croûte et au cœur du fromage) (Choi et al., 2016; Salazar et al., 2018). Les pH des fromages suisses, du Reblochon et du Cheddar se situent dans la même gamme que le Gouda (Almena-Aliste, Montserrat Mietton, 2014; Kongo et al., 2016a).

Les autres données physico-chimiques telles que la concentration en ADN (ng/μl), les teneurs en matière grasse, matière sèche sel et eau, exprimées en %, sont détaillées dans l'Annexe I.

## 4.2. Environnement bactérien

Après extraction de l'ADN des échantillons de fromages, les ratios de pureté ont été déterminés par NanoDrop. Les ratios d'absorbance attendus doivent se trouver dans l'intervalle 1,80-2,20. Les résultats obtenus ont systématiquement présenté des valeurs inférieures. Cependant, ceci n'a pas interféré dans le séquençage, et l'ADN extrait a donc systématiquement pu être amplifié et séquencé.

Après traitement bio-informatique, plus de 256 genres bactériens ont été identifiés au sein des échantillons de fromages. Dans un premier temps, les communautés bactériennes seront détaillées comme suit : dans l'ensemble des fromages, selon le type de fromage (frais, mou, ou pressé), selon le type de lait (lait cru ou pasteurisé) et enfin selon l'origine du lait (vache, chèvre, ou brebis). Afin de faciliter la présentation des résultats obtenus, seuls les genres représentant plus de 0,10 % des reads totaux seront détaillés. Cette phase descriptive sera suivie par l'étude de la diversité à des échantillons, expliquée par les indices de Chao1, Shannon, Inverse de Simpson, et par le nombre d'OTUs présents. Enfin, une étude sur la diversité  $\beta$ , décrite à l'aide d'une ACP, sera proposée. Le but de cette analyse a été d'étudier la diversité au sein des échantillons. Cependant, une étape de pré-traitement a été nécessaire afin de réduire le nombre de variables et donc de faciliter l'interprétation. Ainsi, seuls les genres représentant plus de 0,01 % des reads ont été retenus. Le Tableau 6 reprend le nombre de genres représentant plus 0,10 % et 0,01 % des reads totaux présents dans les échantillons, selon le type de fromages, le type de lait et l'origine animale du lait.

Tableau 6: Nombre de genres présents à 0,1 % et 0,01 % dans les échantillons selon le type de fromage, le type de lait et l'origine animale du lait, avec ou sans masquage des genres *Lactococcus* et *Streptococcus*.

|                        | > 0,1%        |               | > 0,01%       |               |
|------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                        | Sans masquage | Avec masquage | Sans masquage | Avec masquage |
| <b>Frais</b>           | 5             | 72            | 45            | 140           |
| <b>Mou</b>             | 17            | 40            | 45            | 134           |
| <b>Pressé</b>          | 10            | 29            | 28            | 109           |
| <b>Lait cru</b>        | 11            | 44            | 54            | 145           |
| <b>Lait pasteurisé</b> | 4             | 51            | 10            | 51            |
| <b>Vache</b>           | 11            | 41            | 50            | 143           |
| <b>Chèvre</b>          | 3             | 34            | 36            | 81            |
| <b>Brebis</b>          | 5             | 59            | 12            | 34            |

Deux genres bactériens dominaient la communauté bactérienne des échantillons : *Lactococcus* et *Streptococcus*. Ces bactéries lactiques, à cause de leur abondance relative (AR) élevée, ont rendu complexe l'interprétation de la présence d'autres genres bactériens. C'est pourquoi, pour chaque analyse selon le type de fromage, le type de lait et l'origine du lait, une comparaison sans et avec masquage de ces deux genres a été réalisée.

## 4.2.1. Présentation générale

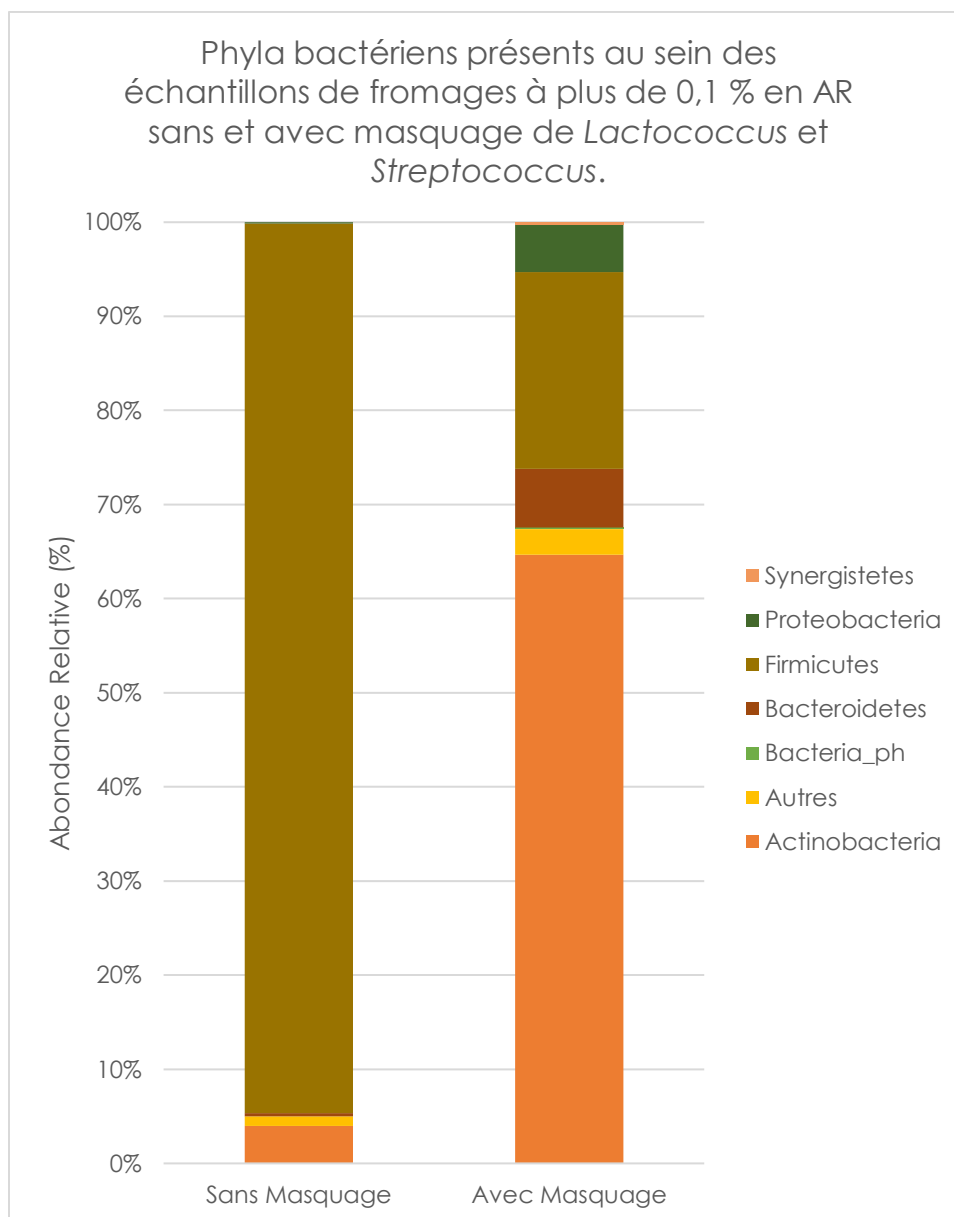
### 4.2.1.1. Phyla rencontrés

Six phyla bactériens ont été rencontrés au sein de l'ensemble des échantillons de fromage : *Actinobacteria*, *Bacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* et *Synergistetes*. Sans masquage de *Lactococcus* et *Streptococcus*, une dominance de *Firmicutes* (94,54 %) est observée (Figure 8). Ceci est dû à l'appartenance de ces deux genres à ce phylum. Ensuite viennent les *Actinobacteria*, représentant 3,96 % des reads, suite à la présence de *Bifidobacterium* et *Brevibacterium*. Enfin, le troisième phylum le plus rencontré est *Bacteroidetes*, lié au genre *Bacteroides*.

Lorsque *Lactococcus* et *Streptococcus* ne sont pas pris en compte, les AR des autres genres bactériens présents dans les autres phyla sont bien entendu augmentées. Ici, *Firmicutes* (20,91 %) devient le second phylum le plus rencontré. *Actinobacteria* représente alors 64,67 % des reads. Ceci est expliqué par les genres *Brevibacterium* (27,57 %), *Bifidobacterium* (21,09 %), *Brachybacterium* (8,97 %), *Microbacterium* (5,35 %), et

*Corynebacterium* (1,02 %). *Bacteroidetes* (6,23 %) est le troisième phylum en AR, ce qui s'explique principalement par le genre *Bacteroides* (5,19%). Les *Proteobacteria* représentent 5,04 % des reads, avec notamment la présence des genres *Halomonas* (1,90 %), *Psychrobacter* (0,93 %), *Pseudomonas* (0,74 %), *Ralstonia* (0,39%), *Parasutterella* (0,23 %), *Hafnia-Obesumbacterium* (0,17 %) et *Photobacterium* (0,10 %) et d'*Enterobacteriaceae* de genre non identifié (0,59 %). Enfin, deux autres phyla à moins de 1 % d'AR sont également présents : *Synergistetes* et des bactéries non identifiées.

La présence de *Firmicutes* en majorité n'est pas une surprise. En effet, les bactéries lactiques primaires tels que *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* appartiennent à ce phylum (O'Sullivan et al., 2017; Falardeau et al., 2019). *Proteobacteria*, *Actinobacteria* et *Bacteroides* figurent aussi parmi les phyla présents dans les fromages (O'Sullivan et al., 2017; Falardeau et al., 2019). *Synergistetes* est le dernier phylum détecté suite à la présence du genre *Pyramidobacter*. Cependant, le lien de ce genre avec le lait et ses produits dérivés n'est pas encore expliqué dans la littérature.



**Figure 8: Phyla bactériens présents au sein des échantillons de fromages à plus de 0,10 % en AR sans et avec masquage de *Lactococcus* et *Streptococcus*.**

#### 4.2.1.2. Genres bactériens rencontrés

Au sein des échantillons de fromages, 11 genres différents sont observés (Tableau 7). Parmi ceux-ci figurent principalement *Lactococcus* (75,17 %) et *Streptococcus* (18,55 %) suivi par *Brevibacterium* (1,73 %) et *Bifidobacterium* (1,32 %) (Figure 9). Les autres genres bactériens sont présents à moins de 1 % d'AR. *Brachybacterium* a une AR de 0,56 %, *Leuconostoc* est présent à 0,39 %, *Microbacterium* à 0,34 %, *Staphylococcus* et *Bacteroides* à 0,33 % (Figure 9). Les 39 genres suivants sont présents à moins de 0,10 % tels que *Lactobacillus* (0,03 %), *Corynebacterium* (0,06 %) et *Psychrobacter* (0,06 %) (Figure 9). Les pourcentages d'AR pour chaque genre cité sont repris dans le Tableau 7.



Tableau 7: AR (%) des genres bactériens au sein des échantillons sans et avec masquage de *Lactococcus* et *Streptococcus*.

| Genre                              | Sans Masquage (%) | Avec Masquage (%) |
|------------------------------------|-------------------|-------------------|
| <b><i>Lactococcus</i></b>          | 75,17             | -                 |
| <b><i>Streptococcus</i></b>        | 18,55             | -                 |
| <b><i>Brevibacterium</i></b>       | 1,73              | 27,57             |
| <b><i>Bifidobacterium</i></b>      | 1,32              | 21,09             |
| <b><i>Brachybacterium</i></b>      | 0,56              | 8,97              |
| <b><i>Leuconostoc</i></b>          | 0,39              | 6,19              |
| <b><i>Microbacterium</i></b>       | 0,34              | 5,35              |
| <b><i>Staphylococcus</i></b>       | 0,33              | 5,28              |
| <b><i>Bacteroides</i></b>          | 0,33              | 5,19              |
| <b><i>Halomonas</i></b>            | 0,12              | 1,90              |
| <b><i>Vagococcus</i></b>           | 0,10              | 1,59              |
| <b><i>Lachnospiraceae_ge</i></b>   | < 0,10            | 1,22              |
| <b><i>Faecalibacterium</i></b>     | < 0,10            | 1,20              |
| <b><i>Megasphaera</i></b>          | < 0,10            | 1,05              |
| <b><i>Corynebacterium_1</i></b>    | < 0,10            | 1,02              |
| <b><i>Psychrobacter</i></b>        | < 0,10            | 0,93              |
| <b><i>Pseudomonas</i></b>          | < 0,10            | 0,74              |
| <b><i>Lactobacillus</i></b>        | < 0,10            | 0,52              |
| <b>Autres</b>                      | 1,06              | 10,19             |
| <b>Nombre de Genres bactériens</b> | 11                | 44                |

En masquant les deux genres dominants, *Lactococcus* et *Streptococcus*, d'autres genres bactériens peuvent être plus aisément observés au sein des échantillons. Au total 44 genres sont ainsi détectés (Tableau 7). Les AR de *Brevibacterium* et *Bifidobacterium* sont respectivement de 27,57 % et 21,09 % (Figure 9). Ensuite figurent *Brachybacterium* (8,97 %), *Leuconostoc* (6,19 %), *Microbacterium* (5,35 %), *Staphylococcus* (5,28 %), *Bacteroides* (5,19 %), *Halomonas* (1,90 %), *Vagococcus* (1,59 %), un genre de la famille des *Lachnospiraceae*

(1,22 %), *Faecalibacterium* (1,20%), *Megasphaera* (1,05%) et *Corynebacterium* (1,02%) (Figure 9). *Psychrobacter*, *Pseudomonas* et *Lactobacillus* sont également présents, mais à des AR inférieures à 1,00 % (Figure 9). Ces valeurs s'élèvent respectivement 0,93 %, 0,74 % et 0,52 %.

Parmi les échantillons de fromages, certains pathogènes ont été détectés : *Escherichia-Shigella* (< 0,01 %), un genre non identifié de l'ordre des *Campylobacterales* (< 0,01 %) et *Staphylococcus* (0,28 %). Les genres *Listeria* et *Salmonella* n'ont pas été identifiés au sein des fromages analysés.

*Escherichia-Shigella* et le genre non identifié de l'ordre des *Campylobacterales* sont chacun présent au sein d'un échantillon de fromage parmi les 78 analysés, avec 1 read sur 10.000. Il serait intéressant d'analyser à nouveau les échantillons et de confirmer leur présence par microbiologie classique, au moyen de milieux de culture adaptés.

L'occurrence des *Staphylococcus* semble plus importante. Cependant, les espèces détectées ne sont pas clairement identifiées. Il est alors difficile d'assigner l'OTU à une souche de *Staphylococcus aureus*, l'espèce pathogène. Parmi les échantillons, 11 fromages contiennent des *Staphylococcus* : 4 fromages à pâte pressée et 7 fromages à pâte molle. Il serait intéressant d'effectuer des tests microbiologiques afin d'identifier plus précisément s'il s'agit de *Staphylococcus* producteurs d'entérotoxines et, le cas échéant, de déterminer le niveau de contamination, et donc l'adéquation avec les critères microbiologiques fixés par le Règlement (CE) N° 2073/2005.

Deux autres pathogènes pour l'homme ont été cités au point 1.5 : *L. monocytogenes* et *Salmonella*. Ceux-ci sont absents des échantillons analysés.

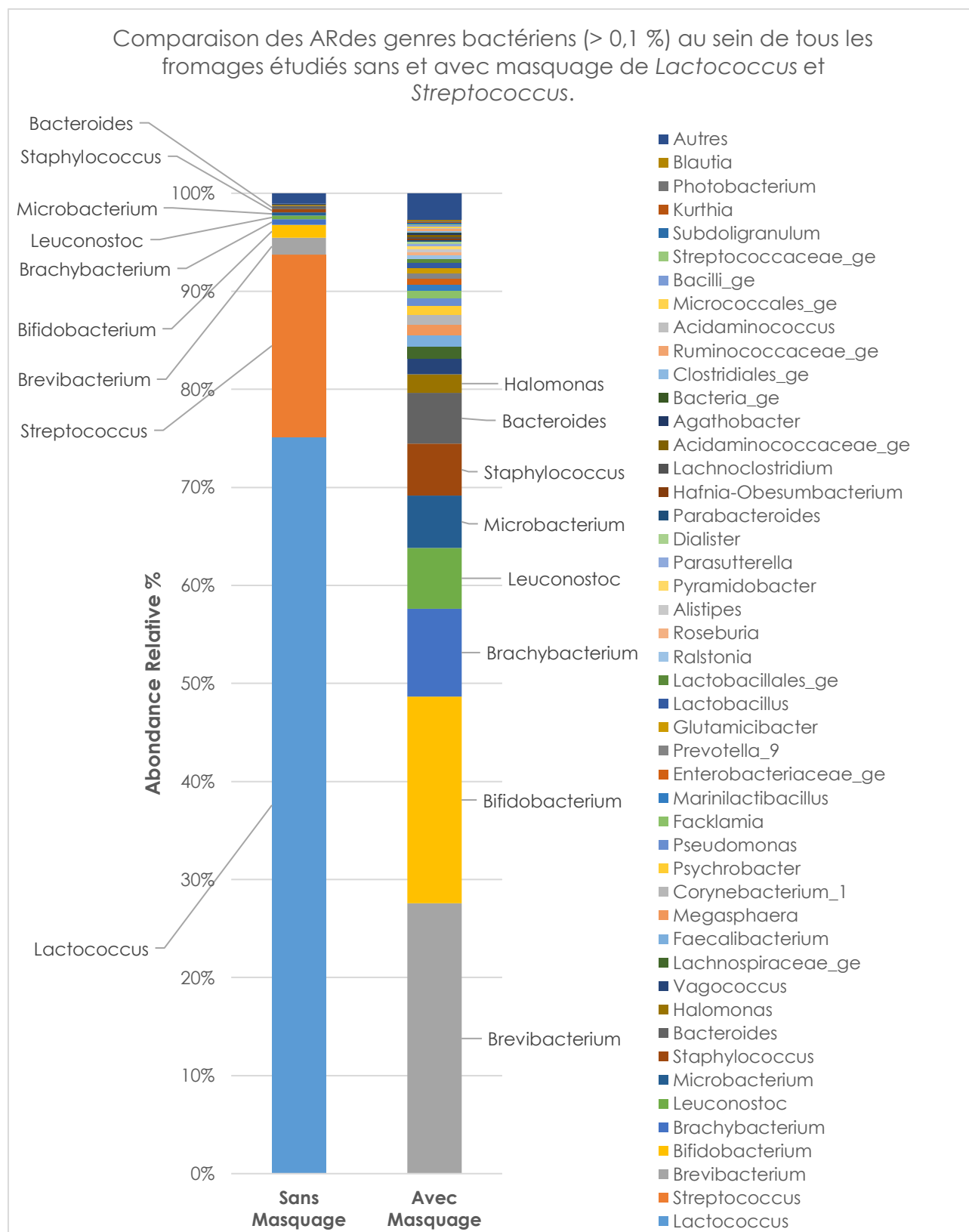


Figure 9: Comparaison des AR des genres bactériens (> 0,1 %) au sein de tous les fromages étudiés sans et avec masquage de *Lactococcus* et *Streptococcus*.

### 4.2.2. Interprétation

L'utilisation de ferments lactiques est fréquente dans la production de fromage, à quelques exceptions près. C'est le cas dans les fromages étudiés dans ce document. Dans ces ferments lactiques figurent les genres bactériens *Lactotoccus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Brevibacterium*.

*Lactotoccus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Leuconostoc* sont des bactéries Gram + et catalase positives (Montel et al., 2014b). Elles ont la capacité de transformer le lactose en lactate (O'Sullivan et al., 2017; Parente et al., 2017). Par conséquent, le pH se voit diminuer par glycolyse, un paramètre important pour la coagulation du lait (Ozturkoglu-Budak et al., 2017). Durant ces réactions de lyse, différents composés produits, tels que des peptides ou amines, apportent une saveur, une texture, une odeur et une structure unique au fromage (Yoon et al., 2016; Ozturkoglu-Budak et al., 2017).

Dans le genre *Brevibacterium*, bactérie Gram +, l'espèce *B. linens* appelé ferment rouge, joue un rôle dans la pigmentation de la surface de certains fromages à croûte lavée (ex. : Herve, Comté, Livarot, Reblochon,...) (Cogan, 2011; Delcenserie et al., 2014; Montel et al., 2014b). En effet, *B. linens* produit des colonies de couleurs jaune pâle à orange foncées (Cogan, 2011). Les espèces appartenant à ce genre bactérien ont la capacité de produire des composés volatils soufrés, avec un impact aromatique intense (Desmasures et al., 2018).

Le genre *Bifidobacterium* appartient à la famille de Bifidobacteriaceae (Montel et al., 2014b). Il est un indicateur de contamination fécale d'origine animale (Yoon et al., 2016). En effet, il a été démontré que ce genre bactérien est associé au tractus gastro-intestinal des mammifères (Frétin et al., 2018). *Bifidobacterium* proviendrait donc du lait cru utilisé pour la production de fromage. L'espèce *B. pseudolongum* est principalement présente dans les fèces animales et absente des fèces humaines (Delcenserie et al., 2011). Cependant, la présence de *Bifidobacterium* peut être bénéfique pour le consommateur. En effet, ce genre fait partie des bactéries ayant des propriétés probiotiques, au même titre que les *Lactobacillus* (Hayaloglu, 2016; O'Callaghan et al., 2019). Cela signifie qu'ils « peuvent exercer des effets bénéfiques sur la santé après ingestion vivants et en quantité adéquate » (Ayerbe et al., 2018). Une autre hypothèse concernant la présence de Bifidobacteriaceae sous forme de trace dans les produits laitiers est leur pulvérisation en tant que probiotique au sein de l'étable, afin d'empêcher la croissance de micro-organismes pathogènes (ex. : *Listeria* ou *Salmonella*) (Ceugniet et al., 2017). Cette dernière hypothèse est toutefois complexe à confirmer.

*Brachybacterium* appartient à la famille Dermabacteraceae (Desmasures et al., 2018). Ce genre bactérien est souvent présent à la surface des fromages pressés, à pâtes molles, ou en particulier au lait de chèvre (Quigley et al., 2012a; Desmasures et al., 2018). Les espèces de ce genre font partie des bactéries d'affinage pour la production de fromage (Frétin et al., 2018).

Le genre *Microbacterium* appartient à la famille Microbacteriaceae (Mounier et al., 2017; Desmasures et al., 2018). Les espèces au sein du genre sont des bactéries Gram + non sporulées (Mounier et al., 2017). Certaines espèces de ce genre jouent des rôles particuliers

au sein des fromages. Par exemple, *M. foliorum* produit des amines biogéniques au sein des fromages à pâte molle (Spinnler, 2017). La présence de *M. gubbeenense* a déjà été rapportée à plusieurs reprises à la surface de différents fromages (ex. : Livarot, Raclette et Tilsit) (Mounier et al., 2017; Desmasures et al., 2018).

Le genre *Bacteroides* de la famille Bacteroïdaceae peut être un signe de contamination fécale du lait de vache (Falardeau et al., 2019). *Bacteroides* est caractéristique de la paille de ferme (Falardeau et al., 2019).

*Vagococcus* et *Facklamia* appartiennent aux bactéries lactiques alcalinophile et halotolérante (HALAB) dont le rôle dans le fromage reste vague (Mounier et al., 2017; Desmasures et al., 2018). Les HALAB sont des bactéries Gram +, catalase –, qui produisent du lactate et d'autres acides organiques comme produits finaux de la fermentation du lactose (Desmasures et al., 2018).

Le genre *Lachnospiracae* est un genre non identifié de la famille des Lachnospiracae (Frétin et al., 2018). Selon une étude, cette famille est rencontrée sur les pis de vache, et peut par conséquent se retrouver dans le lait (Frétin et al., 2018). Ces bactéries ne possèdent à l'heure actuelle aucun rôle connu au sein des fromages.

Les espèces appartenant au genre *Faecalibacterium* sont des bactéries anaérobies strictes et figurent parmi la population bactérienne mineure du lait cru (O'Sullivan et al., 2017; Gobetti et al., 2018). Les espèces de ce genre ont la capacité de produire des composés, incluant le butyrate, le D-lactate, le formate ou l'acétate, durant l'affinage et ont donc un impact sur les saveurs (Quigley et al., 2012b).

Le genre *Megasphaera* est connu pour être présent dans la flore intestinale des ruminants et a déjà été détecté au sein de fromage au lait cru de brebis (Salazar et al., 2018). L'espèce *M. elsdenii* est une bactérie utilisant le lactate chez les ruminants et dont l'AR est élevée durant la diminution du niveau de la matière grasse en cours de lactation (Weimer et al., 2015). En administrant cette espèce au bétail en tant que probiotique, le rendement en lait peut se trouver amélioré et le risque de maladie métabolique diminué (Ye et al., 2018).

Dans la famille Corynebacteriaceae figure le genre *Corynebacterium* (Desmasures et al., 2018). Ce sont des bactéries Gram + et catalase + (Cogan, 2011). Ce genre est présent à la surface des fromages de différents types (ex. : affinés aux moisissures ou à croûtes lavées) (Gelsomino et al., 2005; Mounier et al., 2017; Ozturkoglu-Budak et al., 2017). La plupart du temps, deux espèces de ce genre sont détectées dans les fromages : *C. casei* et *C. variable* (Mounier et al., 2017; Desmasures et al., 2018).

Des espèces du genre *Psychrobacter*, telles que *P. celer* et *P. cibarius*, sont fréquemment détectées dans le lait et le fromage (Desmasures et al., 2018). Elles jouent un rôle dans l'affinage du fromage car elles produisent des composés aromatiques impactant les caractéristiques sensorielles du produit (Desmasures et al., 2018). Elles se développent et survivent à des température faible (10-12°C), à un pH quasi neutre (6 - 8) et à un taux de sel élevé (Desmasures et al., 2018).

Le genre *Hafnia-Obesumbacterium* fait partie de la famille des Enterobacteriaceae (Desmasures et al., 2018). Les genres de cette famille sont des bactéries Gram -, anaérobies facultatives et catalase positive (Mounier et al., 2017; Desmasures et al., 2018). Leur présence au sein des fromages n'est pas étonnante. En effet, *Hafnia* fait partie des genres bactériens marins qu'on retrouve dans la saumure et le sel utilisés pour le salage des fromages (Mounier et al., 2017).

*Pyramidobacter*, du phylum Synergites, est un genre bactérien Gram -, anaérobique, et en forme de pyramide (Downes et al., 2009). Ces micro-organismes sont asaccharolytique et produisent principalement de l'acide acétique et minoritairement de l'acide isovalérique, ainsi que les acides propioniques, isobutyriques, succiniques et phénylacétiques (Downes et al., 2009). Ce genre bactérien est présent dans la muqueuse du colon et du tube digestif des ruminants (Deng et al., 2017). De plus, les *Pyramidobacter* impactent la production de thiamine, un co-enzyme dans la décarboxylation oxydative, où nécessite ce composé pour leur croissance (Pan et al., 2017; DSM, août-1-2019).

La présence des genres bactériens cités précédemment n'est pas une surprise. En effet, certains ont des rôles importants dans la production du fromage tel que les bactéries lactiques ou encore *Brevibacterium* intervenant dans la couleur de la croûte des fromages (Cogan, 2011; O'Sullivan et al., 2017; Parente et al., 2017). Parmi les genres précités, certains n'ont pas de rôle majeur pour la fabrication de fromage, mais trouvent simplement leur origine dans le lait cru. Le rôle des bactéries de la famille des Lachnospiraceae dans la production de fromage est encore vague.

D'autres genres absents dans nos échantillons ont été identifiés par des études reprises dans la littérature. Par exemple, *Leucobacter* est présent dans la Tomme d'Orchies ainsi que dans 12 fromages français (Dugat-Bony et al., 2016; Ceugniet et al., 2017). Ce genre bactérien Gram + et aérobique appartient à la famille des Microbacteriaceae (Larpin-Laborde et al., 2011). Il a été démontré que la croissance de ce genre bactérien serait liée à la présence de *G. candidum* (Mounier et al., 2008; Larpin-Laborde et al., 2011). Des genres bactériens non identifiés de la famille des Bacillaceae sont présents dans le Gouda (Salazar et al., 2018). Ces derniers sont Gram + et hétérotrophe (Salazar et al., 2018). Cette famille est présente dans le lait cru, ce qui explique sa présence dans le fromage (Salazar et al., 2018). *Idiomarina* est présent dans le Brie (Falardeau et al., 2019). C'est un genre bactérien Gram -, aérobique et halophilique appartenant à la famille Idiomarinaceae (Taborda et al., 2009). Il est présent dans le sel marin utilisé dans la saumure pour le salage du fromage de Brie (Falardeau et al., 2019). Un autre genre absent dans les échantillons est *Psychroflexus*, des bactéries Gram -, aérobies strictes, de la famille Flavobacteriaceae (Seiler et al., 2012). Il a été détecté dans les fromages à Raclette ainsi que dans d'autres fromages français (Seiler et al., 2012; Delcenserie et al., 2014; Dugat-Bony et al., 2016). Il aurait un rôle dans la coloration de la morge de ces fromages (Seiler et al., 2012; Delcenserie et al., 2014; Dugat-Bony et al., 2016). *Arthrobacter* figure aussi parmi les genres bactériens absents des échantillons étudiés. Il comprend des bactéries Gram + et aérobies de la famille Micrococcaceae (Irlinger et al., 2005). Elles seraient présentes dans les

fromages à croûtes fleuries tels que le Brie et le Camembert ou encore au sein de fromages de chèvre (Corsetti et al., 2001; Quigley et al., 2012b).

### 4.2.3. Selon le type de fromage

Parmi les échantillons de fromages analysés, sept lots en triplicats sont des fromages frais, sept lots en triplicats sont des fromages à pâte molle et douze lots en triplicat sont des fromages à pâte pressée.

**Tableau 8: Nombres de genres bactériens selon le type de fromages avec ou sans masquage de *Lactococcus* et *Streptococcus*.**

| Types de Fromages     | Sans masquage | Avec masquage |
|-----------------------|---------------|---------------|
| <b>Frais</b>          | 5             | 72            |
| <b>Pâtes molles</b>   | 17            | 40            |
| <b>Pâtes pressées</b> | 10            | 29            |

Sans masquage des genres prédominants *Streptococcus* et *Lactococcus*, 17, 10, et 5 genres bactériens ont été observés au sein des pâtes molles, pressées, et fraîches, respectivement (Tableau 8). La dominance des genres *Lactococcus* et *Streptococcus* est visible sur le graphique de la Figure 10. Pour les fromages à pâte molle, *Lactococcus* est détecté avec des AR de 65,12 % et *Streptococcus* 20,20 %. Dans les fromages à pâte pressée, ils sont observés à 64,95 % et 29,40 %, respectivement. De façon relative, ils sont encore davantage présents au sein des fromages frais, représentant respectivement présents à 94,92 % et 3,55 % des reads.

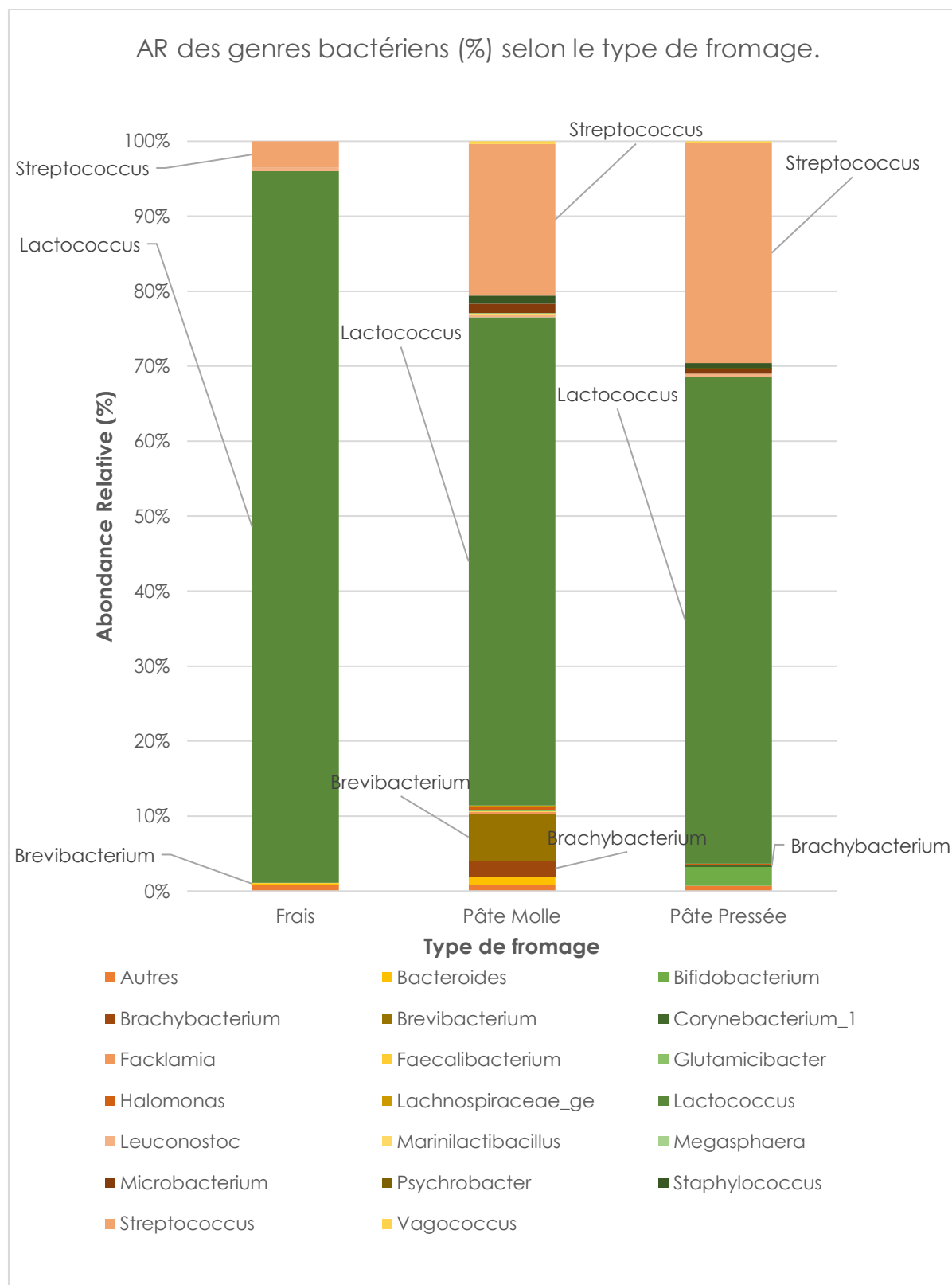


Figure 10: AR des genres bactériens (%) selon le type de fromage.



Tableau 9: AR (%) des genres bactériens selon les types de fromages.

| Genre                          | Pâtes molles (%) | Pâtes pressées (%) | Frais (%) |
|--------------------------------|------------------|--------------------|-----------|
| <b><i>Lactococcus</i></b>      | 65,12            | 64,95              | 94,92     |
| <b><i>Streptococcus</i></b>    | 20,20            | 29,40              | 3,55      |
| <b><i>Brevibacterium</i></b>   | 6,31             | < 0,10             | < 0,10    |
| <b><i>Brachybacterium</i></b>  | 2,05             | < 0,10             | < 0,10    |
| <b><i>Microbacterium</i></b>   | 1,24             | 0,63               | < 0,10    |
| <b><i>Staphylococcus</i></b>   | 1,11             | 0,65               | < 0,10    |
| <b><i>Bacteroides</i></b>      | 1,06             | < 0,10             | 0,13      |
| <b><i>Leuconostoc</i></b>      | 0,26             | 0,42               | 0,43      |
| <b><i>Bifidobacterium</i></b>  | 0,13             | 2,57               | < 0,10    |
| <b><i>Faecalibacterium</i></b> | 0,13             | < 0,10             | 0,11      |
| <b><i>Corynebacterium</i></b>  | < 0,10           | 0,12               | < 0,10    |
| <b>Autres</b>                  | 2,39             | 1,13               | 0,85      |

Au sein des fromages à pâte molle, en plus des genres *Lactococcus* et *Streptococcus*, seuls les genres *Brevibacterium*, *Brachybacterium*, *Microbacterium*, *Staphylococcus* et *Bacteroides* représentent plus de 1 % des reads. Leurs AR sont respectivement de 6,31 %, 2,05 %, 1,24 %, 1,11 % et 1,06 % (Tableau 9). L'AR du genre *Leuconostoc* est de 0,26 % (Tableau 9). D'autres genres ayant un rôle dans le fromage sont présents à moins de 0,1 % : *Lactobacillus* (0,05 %), *Psychrobacter* (0,02 %) et *Corynebacterium* (0,08 %).

Parmi les fromages à pâte pressée, seuls trois genres représentent plus de 1,00 % des reads. À côté des deux genres lactiques dominants, *Bifidobacterium* est le troisième genre le plus présent, avec une abondance relative de 2,57 %. Ensuite, entre 0,10 et 1,00 % d'AR se trouvent les genres *Staphylococcus* (0,65 %), *Microbacterium* (0,63 %), *Leuconostoc* (0,42 %), *Corynebacterium* (0,12 %), *Psychrobacter* (0,10 %). Deux autres genres ayant un rôle dans le fromage sont présents à moins de 0,10 % : *Brevibacterium* (0,07 %) et *Lactobacillus* (0,04 %) (Tableau 9).

Au sein des fromages frais, seuls *Streptococcus* et *Lactococcus* représentent plus de 1,00 % des reads. Les autres genres sont présents à moins de 0,50 %. Les AR de *Leuconostoc*, *Bacteroides* et *Faecalibacterium* sont supérieures à 0,10 %, respectivement égales à 0,43 %, 0,13 %, et 0,11 % (Tableau 9). Certains genres bactériens jouant un rôle dans le fromage sont

présents à moins de 0,1 %. Par exemple, *Lactobacillus* et *Psychrobacter* sont respectivement présents à 0,02 % et 0,01 %.

En ne tenant pas compte de *Lactococcus* et *Streptococcus*, les abondances relatives des genres cités précédemment sont bien entendu plus élevées, mais cela permet aussi de révéler d'autres micro-organismes (Figure 11). En effet, le nombre de genres bactériens observable suite au masquage est bien plus important (Tableau 8).

Le nombre de genres est alors de 72 au sein des fromages frais. *Leuconostoc* prend le dessus avec une AR de 28,22 %. Il est suivi par *Bacteroides* (8,44 %), *Faecalibacterium* (7,34 %), un genre de la famille des Lachnospiraceae (5,97 %), un genre appartenant aux Enterobacteriaceae (4,56 %), *Megasphaera* (4,31 %) et *Prevotella* (3,09 %) (Tableau 10). *Lactobacillus*, *Psychrobacter* et *Corynebacterium* ont une abondance relative de 1,03 %, 0,78 %, et 0,09 %, respectivement (Tableau 10).

Ensuite, pour les fromages à pâte molle, 40 genres bactériens sont identifiés. Les genres *Brevibacterium*, *Brachybacterium*, *Microbacterium*, *Staphylococcus* et *Bacteroides* sont majoritaires, avec une AR respective s'élevant à 42,21 %, 13,72 %, 8,29 %, 7,40 % et 7,10 % (Tableau 10). S'ensuivent les genres avec une AR inférieure à 5,00 %, tels que *Leuconostoc* (1,76 %), *Corynebacterium* (0,56 %), *Lactobacillus* (0,36 %) et *Psychrobacter* (0,15 %) (Tableau 10).

Enfin, en ce qui concerne les fromages à pâte pressée, la communauté bactérienne compte 49 genres. Celle-ci est dominée par *Bifidobacterium* (45,54 %), *Staphylococcus* (11,57 %), *Microbacterium* (11,17 %) et *Leuconostoc* (7,37 %) (Tableau 10). Ensuite, les genres à moins de 5,00 % d'abondance relative sont *Halomonas* (4,22 %), *Vagococcus* (3,53 %), *Corynebacterium* (2,14 %), *Psychrobacter* (1,86 %), *Brevibacterium* (1,30 %) et *Lactobacillus* (0,63 %) (Tableau 10).

En comparant les genres bactériens en fonction du type de fromage, les abondances relatives diffèrent (Figure 11). En effet, *Lactococcus* est plus abondant au sein des fromages frais (94,92 %) par rapport aux fromages à pâte molle (65,12 %) et à pâte pressée (64,95 %). Cette tendance a également été observée lors d'une étude sur 62 fromages irlandais (Quigley et al., 2012a). Pour ce qui est de *Streptococcus*, les AR s'élèvent, pour les fromages frais, à pâtes molles et à pâtes pressées, à 3,55 %, 20,20 % et 29,40 %, respectivement. Les AR de ces deux genres sont donc plus élevées dans les fromages frais en comparaison aux deux autres familles technologiques. Cela peut être expliqué par le caillé lactique obtenu grâce à l'emploi de ferments lactiques mésophiles (*Lactococcus* spp. ou *Leuconostoc* spp.) ou thermophiles (*S. thermophilus*), exerçant une activité d'acidification durant une période prolongée (de l'ordre de 24h), et se multipliant donc simultanément (Hayaloglu, 2016; Mietton et al., 2018). De plus, ces produits n'étant pas affinés, ils sont beaucoup moins susceptibles d'être colonisés ou contaminés par des bactéries de l'environnement. Au contraire, les fromages à pâte molle ou à pâte pressée requièrent la présence ou l'ajout de ferments d'affinage, tels que *B. linens* qui impacte la couleur de la surface du fromage, ou les bactéries propioniques aidant à la formation des

yeux suite à la production de CO<sub>2</sub> dans les fromages à pâte pressée de type Emmental (Cogan, 2011; Düsterhöft et al., 2017).

En masquant *Lactococcus* et *Streptococcus*, la présence de *Leuconostoc* est plus prononcée. Tout comme pour *Lactococcus* et *Streptococcus*, ce genre est plus présent dans les fromages frais (28,22 %) que dans les pâtes molles (1,76 %) et pressées (7,37 %) (Tableau 10). *Leuconostoc* appartient également aux bactéries mésophiles impliquées dans la formation du gel lactique pour les fromages frais (Ayerbe et al., 2018).

*Brevibacterium* est le genre bactérien présentant la plus haute abondance relative lors du masquage de *Lactococcus* et *Streptococcus* au sein des fromages à pâte molle (42,21 %). Sa présence est beaucoup plus faible dans les fromages frais (< 0,10 %) et les fromages à pâte pressée (1,30 %). Ceci peut s'expliquer par l'utilisation de l'espèce *B. linens*, le ferment rouge, dans les fromages à croûte lavée (Desmasures et al., 2018).

Tous les fromages étudiés ont été produits avec l'ajout de ferments. Il est donc évident de retrouver les genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, et *Lactobacillus*. Ils sont en effet présents dans la plupart des ferments disponibles dans le commerce. Cependant, il est surprenant d'obtenir des AR aussi faibles pour le genre *Lactobacillus*. En cas de masquage des deux genres dominants, dans les fromages frais, à pâte molle et pâte pressée, il ne représente que 1,03 %, 0,36 % et 0,63 % d'AR, respectivement. Une étude sur la Tomme d'Orchies a également observé une diminution de *Lactobacillus* durant l'affinage (Ceugniet et al., 2017). Différentes hypothèses pourraient expliquer cette tendance. La présence de la population dominante de *Lactococcus* pourrait avoir favorisé la croissance d'une autre population bactérienne ou la production de bactériocines dirigées contre les *Lactobacillus* (Ceugniet et al., 2017).

Les genres suivants figurent fréquemment dans la morge de surface des fromages : *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* et *Microbacterium* (Cogan, 2011). Plus précisément, *Brachybacterium* (famille Dermabacteraceae) figure dans les croûtes des fromages pâtes molles et pressées (Desmasures et al., 2018). Leur présence dans les fromages analysés est donc logique.

Comme dit précédemment, le genre *Microbacterium* produit des amines biogéniques au sein des fromages à pâte molle et est présent sur la croûte des fromages à pâte molle, tels que le Herve (Delcenserie et al., 2014; Spinnler, 2017). Il n'est pas étonnant de le retrouver parmi les fromages à pâte molle (8,29 %) et à pâte pressée (11,17 %) avec des AR assez importantes.

*Enterobacteriaceae\_ge* est un genre non identifié appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. Son AR correspond à 4,56 % au sein des fromages frais, mais est inférieure à 1,00 % au sein des autres types. Les coliformes appartiennent à cette famille. Il s'agit de bactéries Gram -, mésophiles, avec la capacité de fermenter le lactose (Perin et al., 2019). De plus, elles sont capables de cataboliser le citrate, les lipides, et les protéines, en composés aromatiques bénéfiques pour l'arôme et le goût du fromage (Montel et al., 2014b). Sa présence peut également être due à une contamination du matériel et de

l'environnement de production (Pyz-Łukasik et al., 2018). Parmi les Enterobacteriaceae figurent également les salmonelles, associées à des maladies pathogènes pour l'Homme (Brisabois et al., 2016). L'identification non précise du genre peut être due à un manque d'information au sein de la base de données SILVA qui a été utilisée pour l'identification taxonomique des échantillons. Une autre hypothèse pourrait être la présence d'un bug informatique lors de l'alignement des séquences à l'aide de MOTHUR, ayant pu causer ce manque de précision lors de l'identification.

*Halomonas* est un genre bactérien de la famille des Halomonadaceae (Desmasures et al., 2018). Son AR est de 2,85 % dans les fromages à pâte molle et de 4,22 % dans les fromages à pâte pressée. Certaines espèces tels que *H. venusta*, *H. alkaliphila* et *H. variabilis* ont été détectées dans le lait et sur la croûte de plusieurs fromages (Gelsomino et al., 2005; Quigley et al., 2012a; Desmasures et al., 2018). Ce genre bactérien est considéré comme une protéobactérie halotolérante marine, car détectée dans le sel d'origine marine. (Mounier et al., 2017). Ce sel est bien entendu utilisé lors du salage des fromages, tant à la volée qu'en saumure.

Le genre *Prevotella* appartient à la famille des Prevotellaceae (Montel et al., 2014a). Ce genre bactérien est connu comme faisant partie de la population minoritaire du lait cru (O'Sullivan et al., 2017). De plus, il est associé à l'environnement microbien de la surface des fromages affinés (Quigley et al., 2012a; Montel et al., 2014b; Mounier et al., 2017). Les espèces du genre *Prevotella* sont Gram –, anaérobiques, et commensales des bovins et ovins (Quigley et al., 2012b). Certaines espèces de ce genre pourraient être responsables de maladies parodontales chez l'humain (Quigley et al., 2012b). Il serait intéressant d'effectuer des analyses microbiologiques afin de déterminer jusqu'à quel niveau la présence de *Prevotella* spp. dans les denrées alimentaires peut être tolérée. L'AR de *Prevotella* est plus élevée au sein des fromages frais (3,09 %) que dans les pâtes molles (0,43 %) et pressées (0,14 %). Ceci pourrait s'expliquer par le type de lait utilisé. Parmi les 7 fromages frais et les 7 pâtes molles étudiées, 6 et 6 ont été fabriquées à partir de lait cru, contre 9 sur 12 pour les pâtes pressées. D'un point de vue ratio, l'influence de l'utilisation de lait cru sur les espèces microbiennes rencontrées est plus importante pour les fromages frais et les pâtes molles.

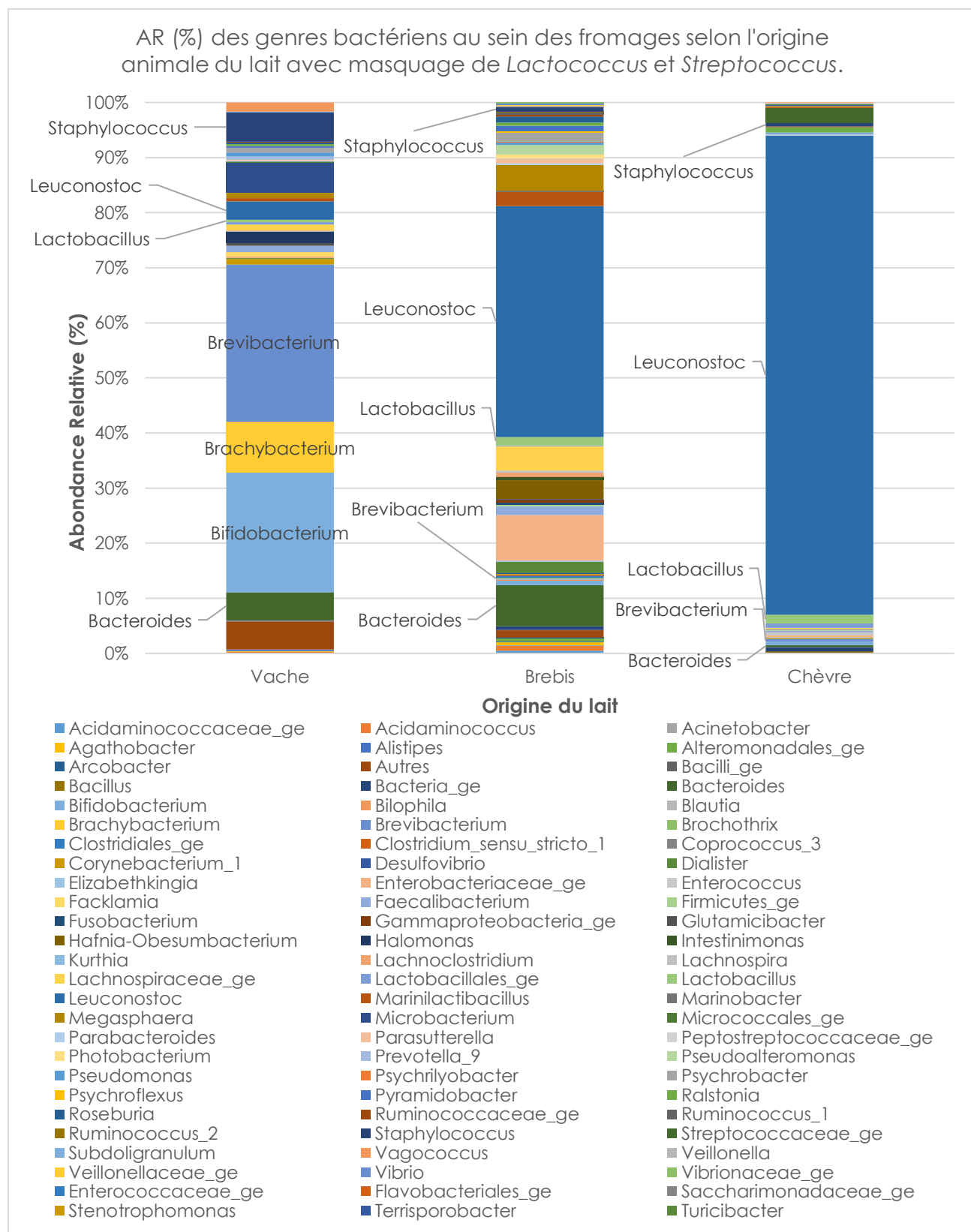


Figure 11: AR (%) des genres bactériens au sein des fromages selon l'origine animale du lait avec masquage de *Lactococcus* et *Streptococcus*.

Tableau 10: AR (%) des genres bactériens selon le type de fromage avec masquage de *Lactococcus* et *Streptococcus*.

| Genres                       | Frais (%) | Pâtes Molles (%) | Pâtes Pressées (%) |
|------------------------------|-----------|------------------|--------------------|
| <i>Leuconostoc</i>           | 28,22     | 1,76             | 7,37               |
| <i>Bifidobacterium</i>       | 1,13      | 0,87             | 45,54              |
| <i>Microbacterium</i>        | < 0,10    | 8,29             | 11,17              |
| <i>Vagococcus</i>            | < 0,10    | 2,47             | 3,53               |
| <i>Brevibacterium</i>        | < 0,10    | 42,21            | 1,30               |
| <i>Halomonas</i>             | < 0,10    | 2,85             | 4,22               |
| <i>Bacteroides</i>           | 8,44      | 7,10             | 0,22               |
| <i>Faecalibacterium</i>      | 7,34      | 0,88             | 0,35               |
| <i>Lachnospiraceae_ge</i>    | < 0,10    | 1,20             | 1,10               |
| <i>Enterobacteriaceae_ge</i> | 4,56      | 0,38             | 0,11               |
| <i>Megasphaera</i>           | 4,31      | 1,16             | < 0,10             |
| <i>Prevotella_9</i>          | 3,09      | 0,43             | 0,14               |
| <i>Corynebacterium</i>       | < 0,10    | 0,56             | 2,14               |
| <i>Lactobacillus</i>         | 1,03      | 0,36             | 0,63               |
| <i>Psychrobacter</i>         | 0,78      | 0,15             | 1,86               |
| Autres                       | 41,10     | 29,33            | 20,32              |

#### 4.2.4. Selon le type de lait

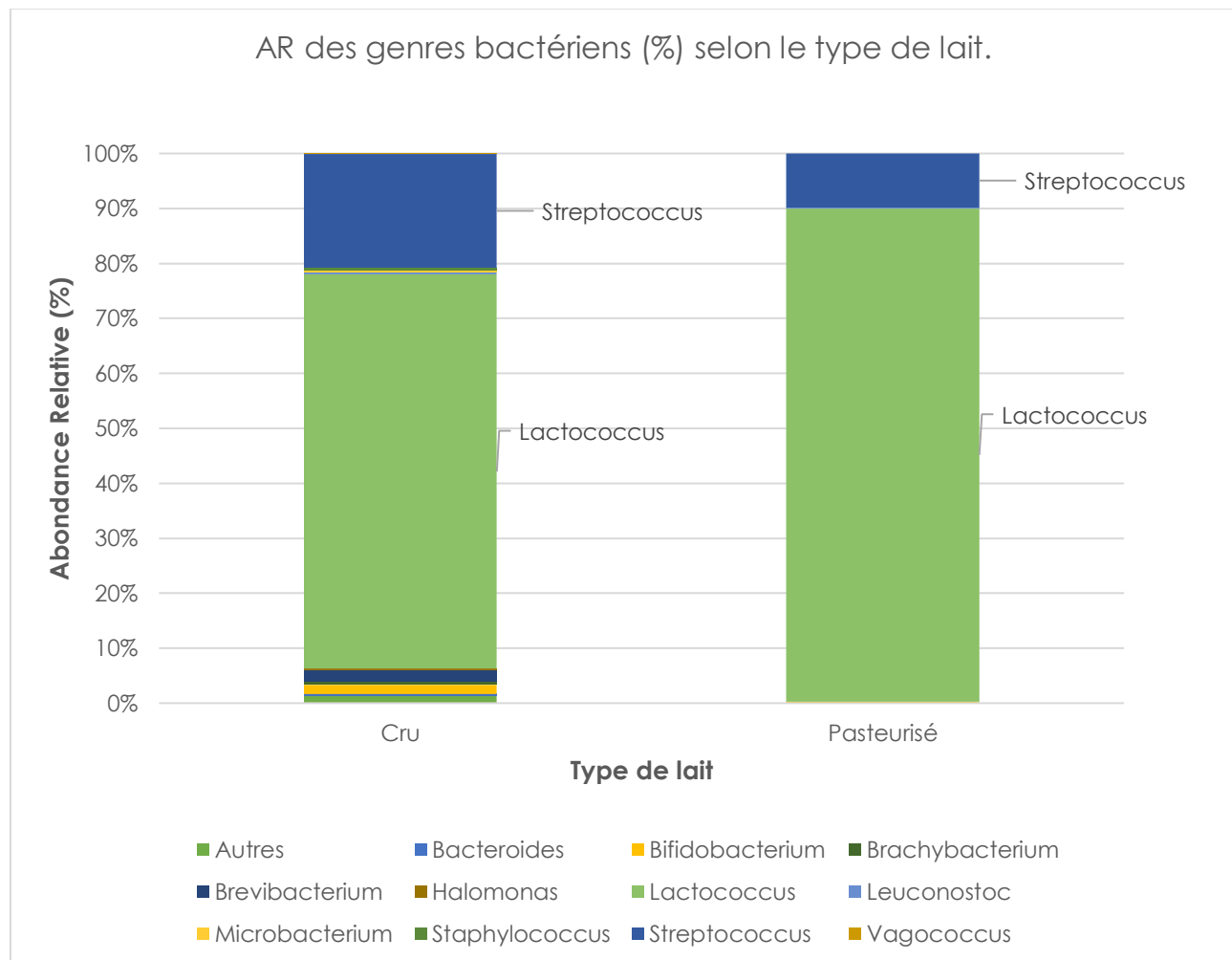
Les fromages étudiés ont été produits à partir de deux types de lait : le lait cru et le lait pasteurisé. Pour le lait cru, 11 genres bactériens sont présents. Pour le lait pasteurisé, ce nombre ne s'élève qu'à 10. Le Tableau 11 suivant reprend les nombres de genres présents selon le type de lait.

Tableau 11: Nombre de genres bactériens dans les fromages selon le type de lait sans ou avec masquage de *Lactococcus* et *Streptococcus*.

| Type de lait    | Sans masquage | Masquage |
|-----------------|---------------|----------|
| Lait cru        | 11            | 43       |
| Lait pasteurisé | 4             | 51       |

Dans les deux cas, *Lactococcus* et *Streptococcus* sont majoritaires (Figure 12). Dans le lait cru, leur AR est respectivement de 71,72 % et 20,61 %. Concernant le lait pasteurisé, cette dernière s'élève à 89,67 % et 9,85 %, respectivement. En ce qui concerne le lait cru, deux genres sont présents à plus de 1,00 % : *Brevibacterium* (2,14%) et *Bifidobacterium* (1,59%). À des AR inférieures se trouvent *Leuconostoc* (0,44 %), *Microbacterium* (0,42 %), *Staphylococcus* (0,41 %), *Corynebacterium* (0,08 %), *Psychrobacter* (0,07 %) et *Lactobacillus* (0,04 %). Pour le lait pasteurisé, les genres présents sont *Bifidobacterium* (0,19 %) et *Leuconostoc* (0,17 %). Au sein du lait pasteurisé, on ne retrouve donc presque que les ferments ajoutés, puisque les micro-organismes caractéristiques du lait cru ont été éliminés au cours du traitement thermique (Salazar et al., 2018).

*Lactococcus* est davantage présent, en AR, au sein du lait pasteurisé (89,67 %) par rapport au le lait cru (71,72 %). Le lait cru comportant davantage de genres bactériens, il est normal que l'AR de *Lactococcus* y soit moins élevée.



**Figure 12:** AR des genres bactériens (%) selon le type de lait.

En masquant *Lactococcus* et *Streptococcus*, le nombre de genres bactériens est plus important. Il y a 43 genres dans les fromages au lait cru et 51 genres dans les fromages

au lait pasteurisé (Tableau 11). *Brevibacterium* (27,96 %) et *Bifidobacterium* (20,81 %) sont les deux genres dominants au sein du lait cru (Figure 13). Ensuite viennent *Brachybacterium* (9,10 %), *Leuconostoc* (5,75 %), *Microbacterium* (5,43 %), *Staphylococcus* (5,35 %) et *Bacteroides* (5,26 %). Concernant *Corynebacterium*, *Psychrobacter* et *Lactobacillus*, ceux-ci sont présents à moins de 5,00 %. Les valeurs sont respectivement de 1,03 %, 0,93 % et 0,52 %. Pour le lait pasteurisé, *Bifidobacterium* (40,11 %) et *Leuconostoc* (35,65 %) sont les genres dominants. Un genre non identifié de la famille des Streptococcaceae est présent à 3,20 %, *Pseudomonas* à 2,51 %, un genre non identifié des Enterobacteriaceae à 1,81 %, *Marinilactobacillus* et *Pseudoalteromonas* à 1,39 %. *Brevibacterium* est présent à 1,11 %, *Lactobacillus* à 0,84 % et *Psychrobacter* à 0,56 %. Toutefois, toutes ces espèces ne se retrouvent qu'à l'état de trace suite au traitement thermique.

La population bactérienne du lait cru est donc plus diverse et hétérogène que la population bactérienne du lait pasteurisé (O'Sullivan et al., 2017). Ceci pourrait justifier le nombre de genres bactérien différents présents dans les fromages sans masquage de *Lactococcus* et *Streptococcus* (Tableau 11). Par contre, avec masquage, le nombre de genres dans les fromages au lait cru diminue (on passe de 53 à 43 genres) et celui du lait pasteurisé augmente (10 à 51). La présence d'autres genres bactériens que ceux ajoutés en tant que ferments au sein des fromages au lait pasteurisé peut s'expliquer par deux hypothèses : une colonisation en post-pasteurisation par des bactéries présentes dans l'environnement de production, de saumurage ou d'affinage, ou l'utilisation d'un barème de pasteurisation inadapté (Montel et al., 2014b).

*Brevibacterium* est plus important dans les fromages à base de lait cru (27,96 %) que de lait pasteurisé (1,11 %). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'ensemble des fromages à pâte molle lavée étudié au cours de ce travail ont été produits à base de lait pasteurisé. Or le genre *Brevibacterium* est typique de ce type de produit.

*Leuconostoc* est un des genres dominants dans les deux types de lait utilisé. Ceci peut être expliqué par son utilisation en tant que ferment quel que soit le type de lait.

*Pseudoalteromonas* est un genre bactérien de la famille des Pseudoalteromonadaceae (Falardeau et al., 2019). Il est détecté à plus de 0,10 % au sein des fromages au lait pasteurisé (1,39 %). Sa présence peut être expliquée par le traitement subit par la surface des fromages lors de l'affinage (ex. : salage du fromage) (Delcenserie et al., 2014). Il constitue, avec *Halomonas* (à 1,24 % dans les fromages au lait cru) et *Marinilactibacillus* (à 0,68 % dans les fromages au lait cru et 1,39 % dans les fromages au lait pasteurisé), trois genres de bactéries marines apportés par les saumures (Mounier et al., 2017). L'absence d'*Halomonas* au sein des fromages au lait pasteurisé a été relevée dans au moins une autre étude (Quigley et al., 2012b; O'Sullivan et al., 2017).



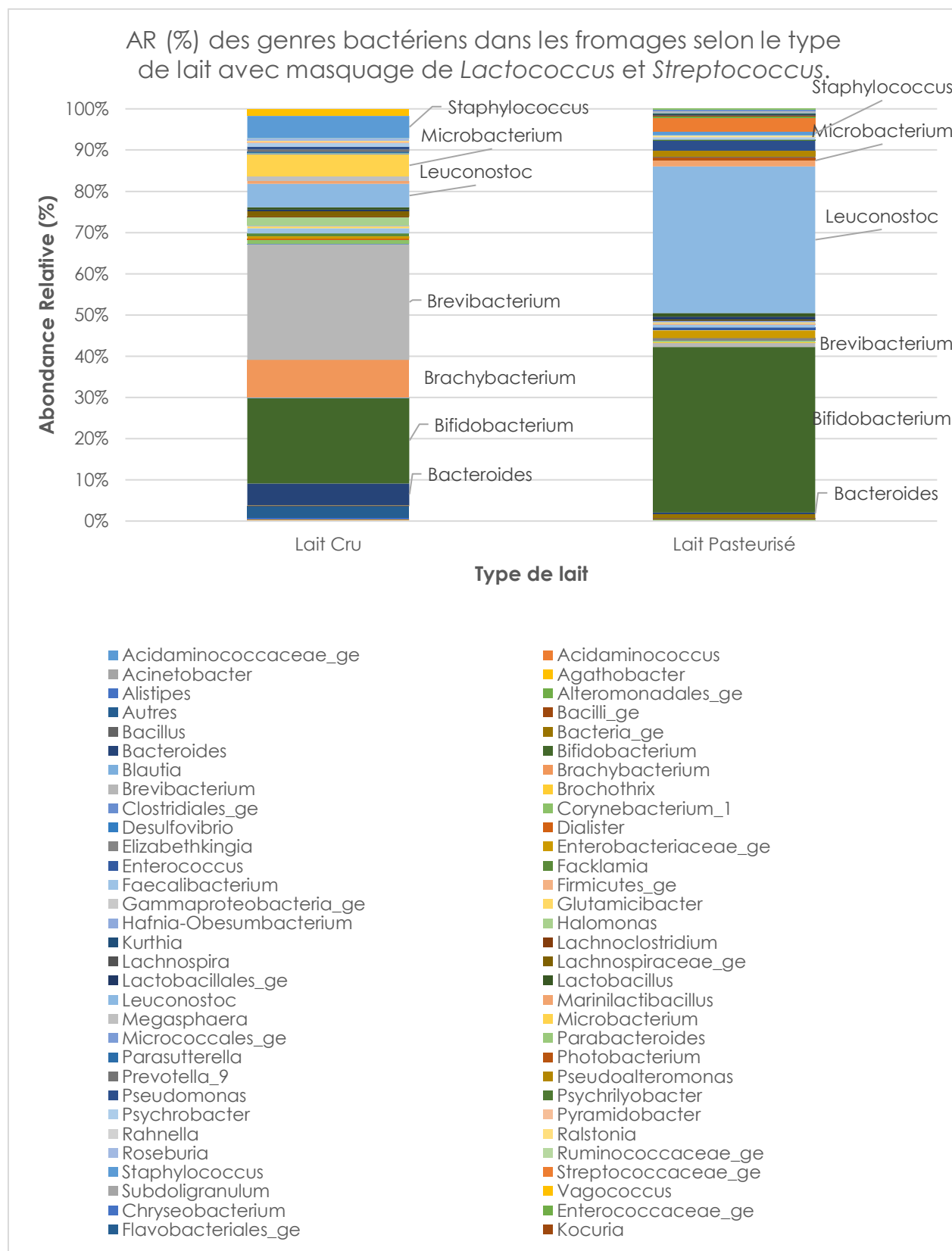


Figure 13: AR (%) des genres bactériens dans les fromages selon le type de lait, avec masquage de *Lactococcus* et *Streptococcus*.

#### 4.2.5. Selon l'origine du lait

Trois origines animales du lait ont été utilisées pour la production des fromages étudiés : vache, brebis et chèvre. Le nombre de fromages pour chacun de ces animaux est respectivement de 20, 3 et 3.

En considérant des AR supérieures à 0,10 %, 11 genres bactériens ont été détectés au sein des fromages au lait de vache. Ces nombres s'élevaient à 3 et 5 pour les produits au lait de brebis et de chèvre, respectivement. Ces chiffres sont repris dans le Tableau 12 avec en comparaison les nombres avec masquage de *Lactococcus* et *Streptococcus*.

**Tableau 12: Nombre de genres bactérien présent dans les fromages selon l'origine animale du lait sans et avec masquage de *Lactococcus* et *Streptococcus*.**

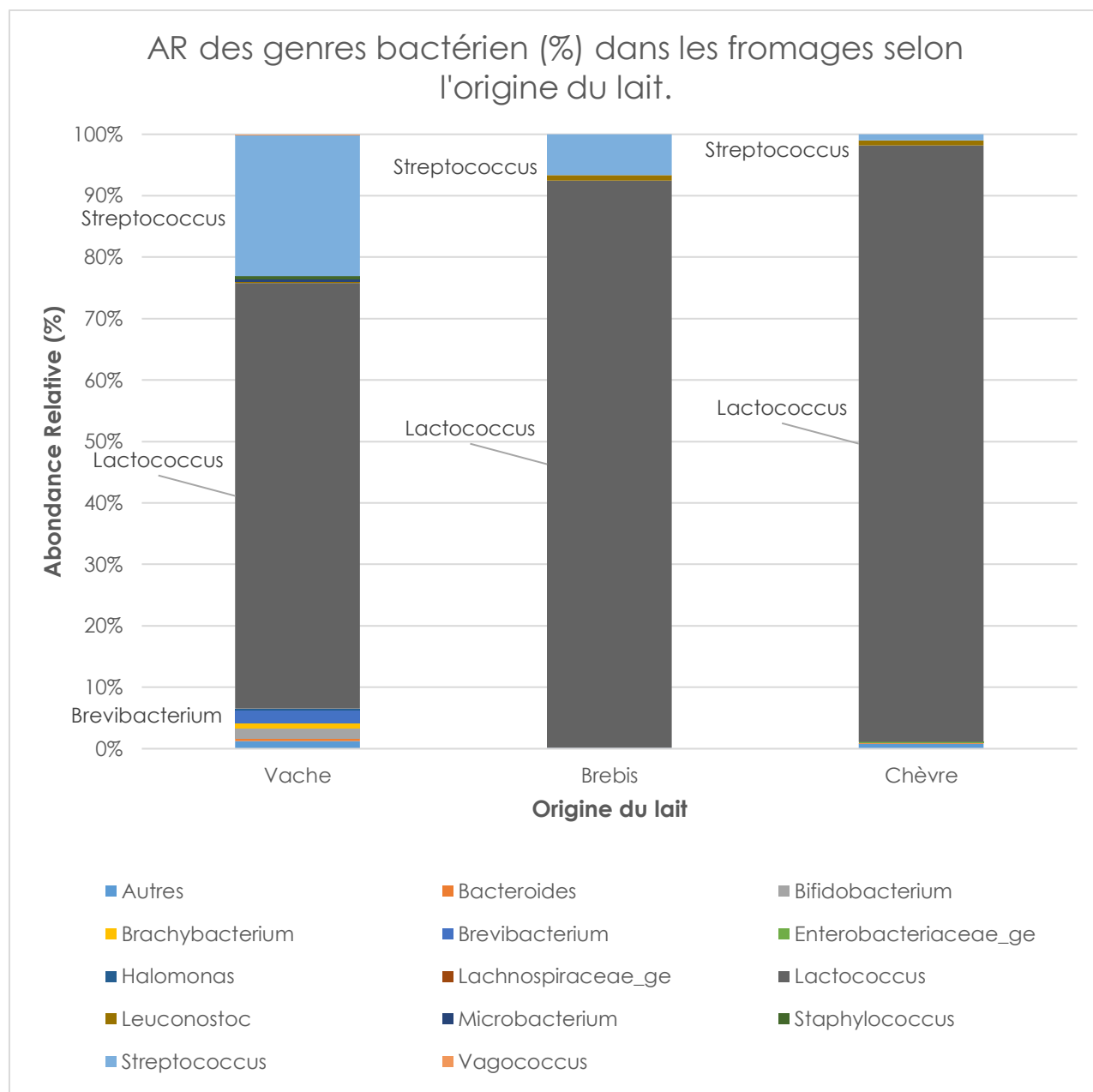
| Origine animale | Sans masquage | Avec masquage |
|-----------------|---------------|---------------|
| <b>Vache</b>    | 11            | 41            |
| <b>Brebis</b>   | 3             | 59            |
| <b>Chèvre</b>   | 5             | 34            |

Comme pour les types de fromages et les types de lait, *Lactococcus* et *Streptococcus* sont majoritaires (Figure 15). *Lactococcus* est présent à 69,30 % dans les fromages à base de lait de vache, 92,35 % dans les fromages à base de lait de brebis et 97,12 % dans les fromages à base de lait de chèvre. En ce qui concerne *Streptococcus*, les AR s'élèvent respectivement à 22,96 %, 6,69 % et 1,02 %.

En ce qui concerne les fromages à base de lait de vache, *Brevibacterium* et *Bifidobacterium* sont à plus de 1,00 %. Leurs AR respectives sont de 2,25 % et 1,72 %. Les autres genres détectés présentent une AR inférieure à 1,00 % : *Brachybacterium* (0,73 %), *Microbacterium* (0,44 %), *Staphylococcus* (0,43 %), *Bacteroides* (0,40 %), *Leuconostoc* (0,26 %), *Halomonas* (0,15 %) et *Vagococcus* (0,13 %).

Le troisième genre identifié au sein des fromages au lait de brebis est *Leuconostoc*, à 0,84 % d'AR. Celui-ci est également présent dans les fromages au lait de chèvre à 0,78 %. Un genre non identifié de la famille des Enterobacteriaceae et le genre *Bacteroides* représentent moins de 0,20 %. Leurs AR sont respectivement de 0,15 % et 0,14 %.

La Figure 14 décrit la répartition des genres bactériens, exprimée en AR (%), au sein des différents fromages selon l'origine animale.



**Figure 14: AR des genres bactériens (%) dans les fromages selon l'origine du lait.**

En masquant *Lactococcus* et *Streptococcus* (Figure 15), il y a 41 genres au sein des fromages à base de lait de vache, 59 parmi les fromages à base de lait de brebis et 34 au sein des fromages à base de lait de chèvre. Ces nombres sont repris dans le Tableau 12.

Dans les fromages à base de lait de vache se rencontrent en majorité *Brevibacterium* (28,39 %), *Bifidobacterium* (21,69 %), *Brachybacterium* (9,24 %), *Microbacterium* (5,51 %), *Staphylococcus* (5,40 %), *Bacteroides* (5,07 %), *Leuconostoc* (3,31 %), *Halomonas* (1,95 %), *Vagococcus* (1,64 %), *Faecalibacterium* (1,18 %) un genre non identifié de la famille des Lachnospiraceae (1,10 %) et *Corynebacterium* (1,05 %). Les autres genres présents sont à moins de 1,00 %.

Dans le cas du lait de brebis, *Leuconostoc* est majoritaire avec une AR de 41,91 %. Il est suivi par un genre non identifié de la famille des Enterobacteriaceae (8,30 %), les *Bacteroides* (7,46 %), les *Megasphaera* (4,72 %), un genre bactérien de la famille des Lachnospiraceae (4,42%), les *Hafnia-Obesumbacterium* (3,46 %), les *Marinilactibacillus* (2,63 %), les *Dalister* (2,03 %), les *Pseudoalteromonas* (1,73 %), les *Faecalibacterium* (1,61 %), les *Lactobacillus* (1,49 %), les *Roseburia* (1,13 %) et les *Pyramidobacter* (1,07 %). Les AR des autres genres bactériens sont inférieures à 1,00 %.

Dans le cas de la chèvre, seuls quatre genres ont une AR supérieure à 1,00 %. *Leuconostoc* prend le dessus à 86,97 %, suivi de bactéries de la famille des Streptococcaceae (2,65 %) et les *Lactobacillus* (1,61 %).

Le nombre de genres bactériens présents selon l'origine animale semble plus important dans les fromages à base de lait de vache que pour les autres animaux. Cette observation a également été relevée dans une étude sur des fromages irlandais (Quigley et al., 2012b). Les différences observées doivent toutefois être tempérées par le fait que le nombre de fromages au lait de brebis ou au lait de chèvre était limité durant cette étude (3 échantillons pour chacun de ces laits). Une hypothèse pouvant toutefois expliquer cette différence serait la différence de composition en protéines et acides gras entre les laits des différentes espèces animales (Fox & McSweeney, 2017; McSweeney et al., 2017).

**Tableau 13: Nombre de fromages selon le type de fromage et origine animale du lait utilisé.**

|                     | Vache | Chèvre | Brebis |
|---------------------|-------|--------|--------|
| <b>Frais</b>        | 4     | 2      | 1      |
| <b>Pâte pressée</b> | 10    | 0      | 2      |
| <b>Pâte molle</b>   | 6     | 1      | 0      |

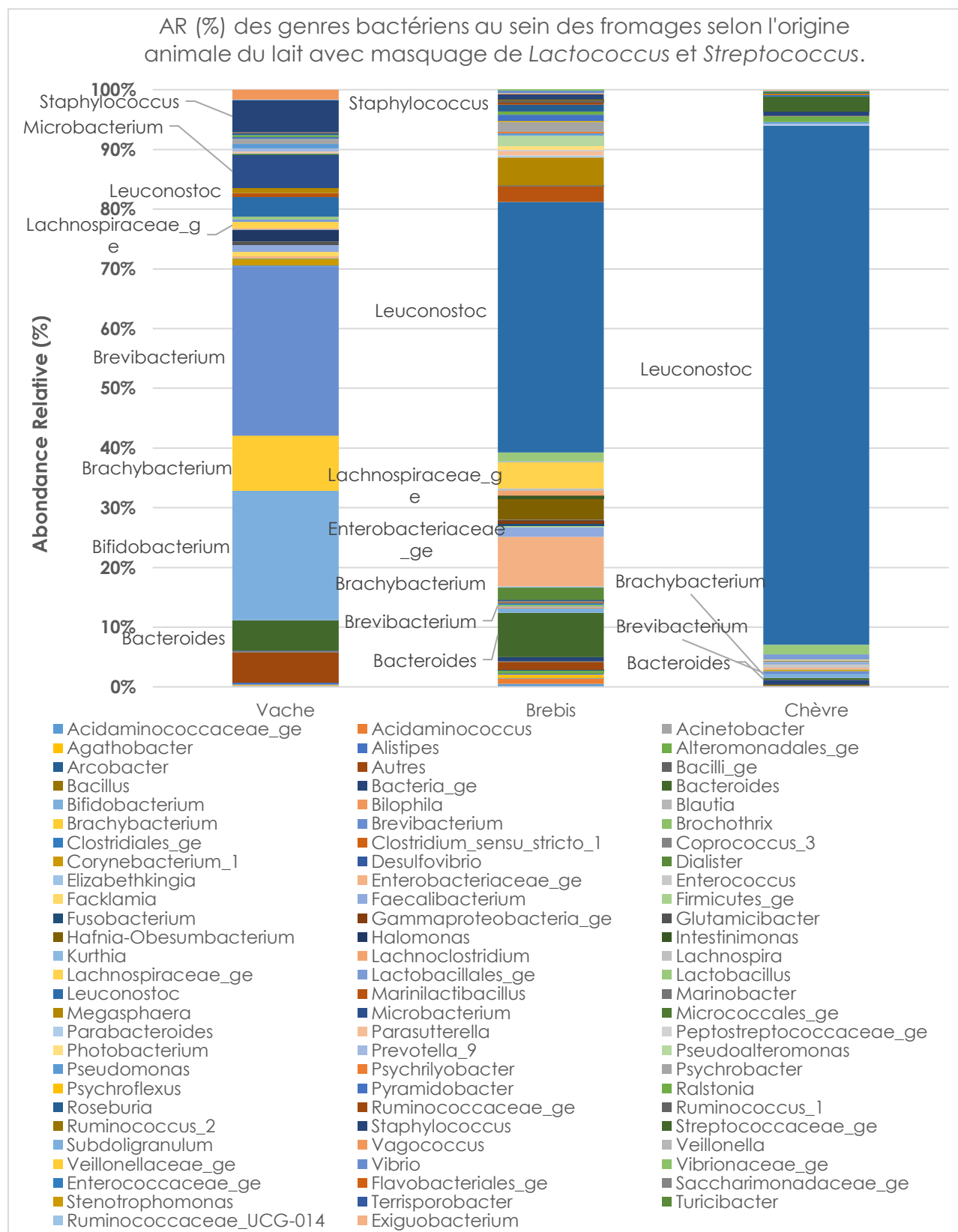


Figure 15: AR (%) des genres bactériens au sein des fromages selon l'origine animale du lait avec masquage de *Lactococcus* et *Streptococcus*.

### 4.3. Diversité $\alpha$

Suite aux tests de Shapiro-Wilk et D'Agostino & Pearson, il a été conclu que les données ne suivaient pas des distributions normales ( $p$ -valeur  $< 0,05$ ). C'est pourquoi des tests non paramétriques ont systématiquement été utilisés pour étudier les différences entre populations bactériennes. En l'occurrence, le test de Kruskal-Wallis corrigé pour un test multiple (Test de Dunn) a été choisi.

Les graphes permettant d'étudier la diversité  $\alpha$  sont proposés sous forme de boîtes à moustache, et reprennent la valeur médiane et les déciles de 10-90 %. Les points sur le graphique représentent les échantillons en dehors de cet intervalle 10-90 %.

#### 4.3.1. Étude de la richesse

L'étude de la richesse des populations au sein des types de fromages est décrite par le nombre d'OTUs observée (Figure 16) et l'indice de Chao1 (Figure 17). Les valeurs de ces deux paramètres sont reprises dans les Tableau 14 et Tableau 15, respectivement.

Tableau 14: Nombres d'OTUs moyens, avec écarts types, médianes, et quartiles (25 % et 75 %).

| Nombre d'OTUs   |         |            |              |         |              |
|-----------------|---------|------------|--------------|---------|--------------|
| Type de fromage | Moyenne | Écart type | 25% quartile | Médiane | 75% quartile |
| Frais           | 54      | 107        | 11           | 15      | 18           |
| Molle           | 73      | 154        | 19           | 33      | 24           |
| Pressée         | 38      | 33         | 40           | 73      | 57           |
| Lait Cru        | 58      | 109        | 11           | 15      | 18           |
| Lait pasteurisé | 25      | 14         | 19           | 33      | 24           |
| Vache           | 56      | 109        | 40           | 73      | 57           |
| Chèvre          | 50      | 78         | 11           | 15      | 18           |
| Brebis          | 25      | 15         | 19           | 33      | 246          |

Tableau 15: Indices de Chao1 moyens, avec écarts types, médianes, et quartiles (25 % et 75 %).

| Indice de Chao1 |         |            |              |         |              |
|-----------------|---------|------------|--------------|---------|--------------|
| Type de fromage | Moyenne | Écart type | 25% quartile | Médiane | 75% quartile |
| Frais           | 125     | 285        | 17           | 32      | 78           |
| Molle           | 167     | 369        | 27           | 88      | 148          |
| Pressée         | 81      | 92         | 29           | 54      | 109          |
| Lait Cru        | 132     | 274        | 25           | 64      | 124          |
| Lait pasteurisé | 51      | 35         | 22           | 39      | 82           |
| Vache           | 126     | 274        | 24           | 65      | 122          |
| Chèvre          | 120     | 182        | 26           | 45      | 128          |
| Brebis          | 45      | 27         | 22           | 39      | 71           |

En observant les graphes des Figure 16 et Figure 17, il semble ne pas y avoir d'écart entre les différentes boîtes à moustaches pour chaque catégorie. Cette hypothèse est confirmée par le test statistique de Kruskal-Wallis combiné avec le Test de Dunn. En effet, pour chaque comparaison entre les types de fromage, les types de lait et entre origine animale, les p-valeur sont systématiquement supérieures à 0,05. Il n'y a donc pas de différence significative de richesse pour les paramètres étudiés.

Nombre d'OTUs observés selon le type de fromages, le type de lait et l'origine animale du lait.

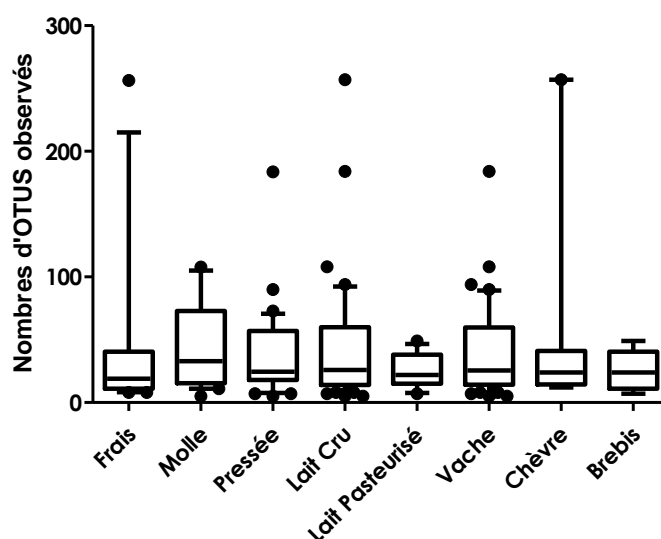
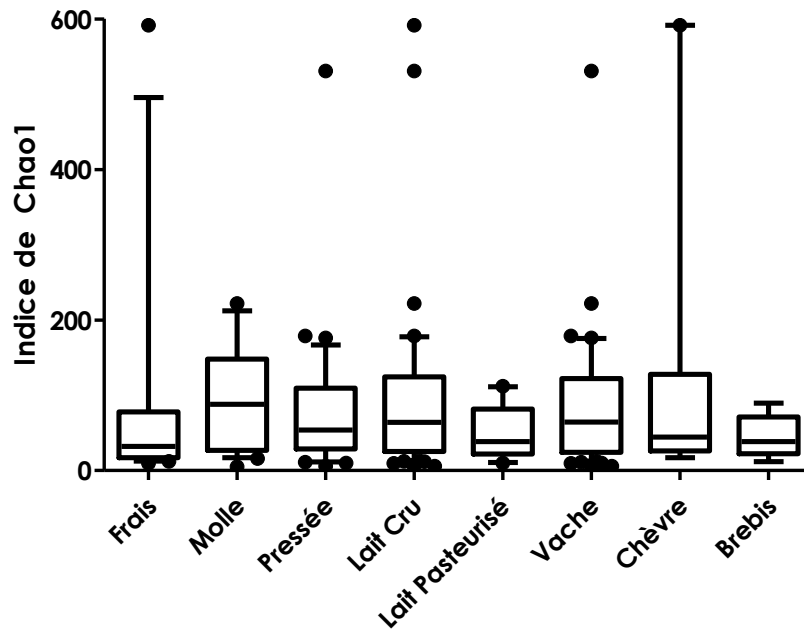


Figure 16: Nombre d'OTUs observé selon le type de fromages, le type de lait et l'origine animale du lait.

**Indice de Chao1 selon le type de fromages, le type de lait et l'origine animale du lait.**



**Figure 17: Indice de Chao1 selon le type de fromages, le type de lait et l'origine animale du lait.**

Durant la détermination des OTUs lors de l'analyse bio-informatique, un nombre important d'OTUs non classées a été identifié. Par exemple, dans les fromages frais, à pâtes molles, à base de lait cru, au lait de vache et lait de chèvre, les écarts types sont respectivement de : 107, 154, 109, 109 et 78 nombres d'OTUs (Tableau 14). Comme expliqué précédemment, il est possible que la base de données utilisée (SILVA Bacteria v1.28 <https://www.arb-silva.de>) ne soit pas suffisamment complète et précise pour identifier l'ensemble des OTUs présentes au sein des échantillons, ou que des erreurs de séquençage se soient produites. La contamination de certains fromages peut également provoquer une augmentation de certaines populations. Tout ceci a bien entendu une répercussion sur l'indice de Chao1, qui correspond au nombre d'espèces non observées à partir de celles observées au moins une fois (Marcon, 2010).



### 4.3.2. Étude de la diversité

L'étude de diversité a été définie par deux indices : l'indice de Shannon (Figure 18) et l'indice Inverse de Simpson (Figure 19). Les valeurs moyennes et les écarts types sont repris dans le Tableau 16 et le Tableau 17, respectivement.

Tableau 16: Indices de Simpson Inverse moyens, avec écarts types, médianes, et quartiles (25% et 75%).

| Simspon inverse |         |            |              |         |              |
|-----------------|---------|------------|--------------|---------|--------------|
| Type de fromage | Moyenne | Écart type | 25% quartile | Médiane | 75% quartile |
| Frais           | 1,70    | 0,56       | 1,191        | 1,701   | 2,165        |
| Molle           | 2,37    | 1,48       | 1,461        | 1,922   | 2,409        |
| Pressée         | 1,61    | 0,32       | 1,337        | 1,660   | 1,840        |
| Lait cru        | 1,88    | 0,98       | 1,330        | 1,701   | 2,015        |
| Lait pasteurisé | 1,67    | 0,43       | 1,329        | 1,676   | 2,088        |
| Vache           | 1,91    | 0,99       | 1,365        | 1,705   | 2,024        |
| Chèvre          | 1,35    | 0,30       | 1,086        | 1,260   | 1,647        |
| Brebis          | 1,84    | 0,41       | 1,461        | 1,943   | 2,151        |

Tableau 17: Indices de Shannon moyens, avec écarts types, médianes, et quartiles (25% et 75%).

| Indice de Shannon |         |            |              |         |              |
|-------------------|---------|------------|--------------|---------|--------------|
| Type de fromage   | Moyenne | Écart type | 25% quartile | Médiane | 75% quartile |
| Frais             | 0,69    | 0,45       | 0,31         | 0,63    | 0,99         |
| Molle             | 1,04    | 0,72       | 0,53         | 0,75    | 1,47         |
| Pressée           | 0,73    | 0,28       | 0,52         | 0,77    | 0,96         |
| Lait cru          | 0,83    | 0,52       | 0,52         | 0,75    | 0,99         |
| Lait pasteurisé   | 0,69    | 0,33       | 0,44         | 0,76    | 0,95         |
| Vache             | 0,85    | 0,52       | 0,52         | 0,77    | 0,99         |
| Chèvre            | 0,49    | 0,35       | 0,22         | 0,38    | 0,67         |
| Brebis            | 0,81    | 0,31       | 0,54         | 0,90    | 1,08         |

Les graphiques reprenant les boîtes à moustaches relatives à l'étude de richesse semblent à nouveau montrer que les valeurs moyennes sont relativement proches les unes des autres (Figure 18, Figure 19).

Selon les types de fromages, la diversité est légèrement supérieure au sein des fromages à pâte molle. Ceci peut s'expliquer par le nombre de genres bactériens présents (17 genres bactériens sans masquage), qui est plus élevé que dans les autres types de fromages. La diversité selon le type de lait est relativement similaire. En ce qui concerne l'origine animale du lait, les fromages au lait de chèvre semblent moins diversifiés que ceux au lait de vache ou au lait de brebis. Ceci peut sembler étonnant au vu du nombre de genres bactériens présents dans les fromages produits à partir de chaque type de lait : 5 genres pour le lait de chèvre, 11 genres pour la vache et 3 genres pour le lait de brebis. Cependant, les indices de Shannon et inverse de Simpson sont basés sur une table d'OTUs et non de genres bactériens. De plus, il ne faut pas écarter le fait que certains OTUs non classés sont comptabilisés comme des OTUs à part entière.

Malgré les différences observées sur les graphes (Figure 18 et Figure 19), aucune différence significative n'est détectée, quel que soit le paramètre étudié ( $p$ -valeur  $> 0,05$ ).

### Indice de Shannon selon le type de fromage, le type de lait et l'origine animale du lait.

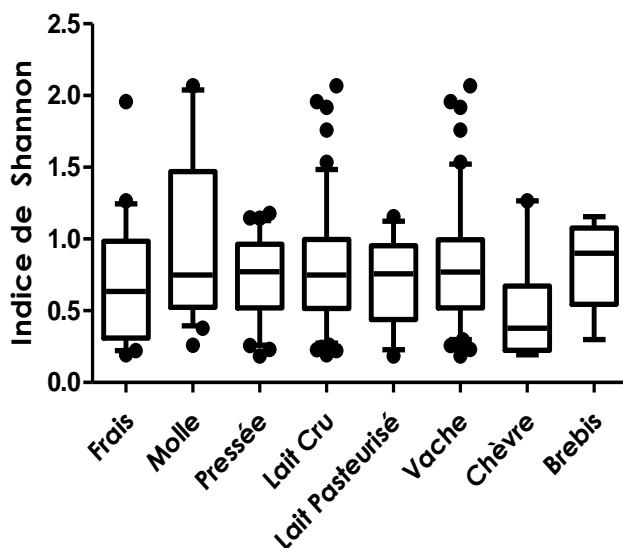


Figure 18: Indice de Shannon selon le type de fromage, le type de lait et l'origine animale du lait.

### Indice inverse de Simpson selon les types de fromages, le type de lait et l'origine animale du lait.

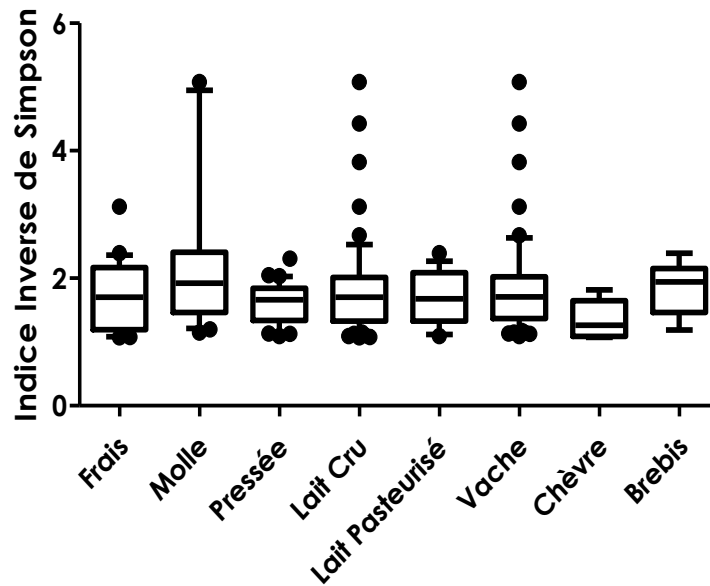


Figure 19: Indice Inverse de Simpson selon le type de fromages, le type de lait et l'origine animale du lait.

En conclusion, aucune différence significative ne peut être déterminée en ce qui concerne la diversité des populations bactériennes au sein des types de fromages, types de lait et selon l'origine animale du lait.

## 4.4. Diversité $\beta$

### 4.4.1. Analyse en composantes principales

La diversité  $\beta$  correspond à l'étude de la variation des espèces entre communautés (Li et al., 2019). Celle-ci a été étudiée à l'aide de l'ACP. Dans un premier temps, il a été nécessaire de déterminer le nombre de composantes à retenir pour expliquer au mieux les différentes tendances entre échantillons. Le choix est déterminé graphiquement (Figure 20). En théorie, le nombre de composantes retenues est le nombre de rangs avant le coude de la droite orange sur la Figure 20 (Palm, 2009). Dans ce cas-ci, pour l'étude sans masquage des genres *Lactococcus* et *Streptococcus*, le nombre de composantes principales à retenir aurait donc dû être de 1. Cependant, la décision a été de conserver 3 composantes afin d'avoir plus d'indications. Avec masquage, le nombre de composantes à conserver s'élevait à 4.

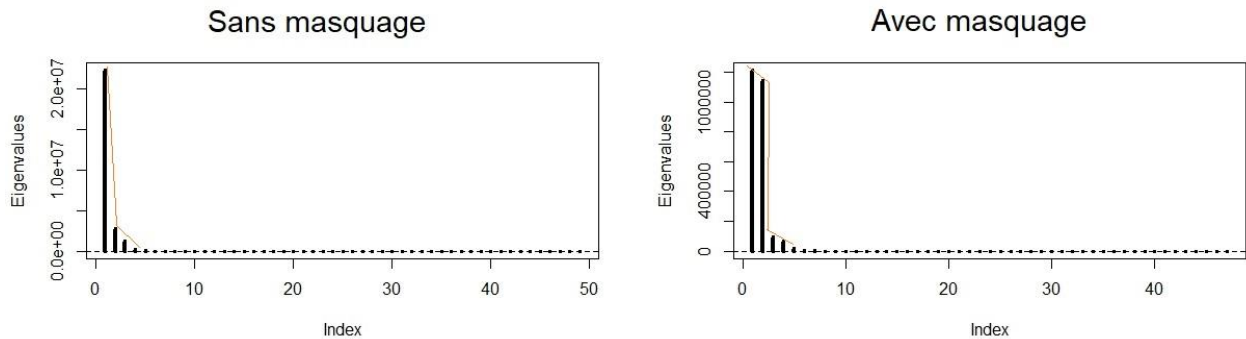


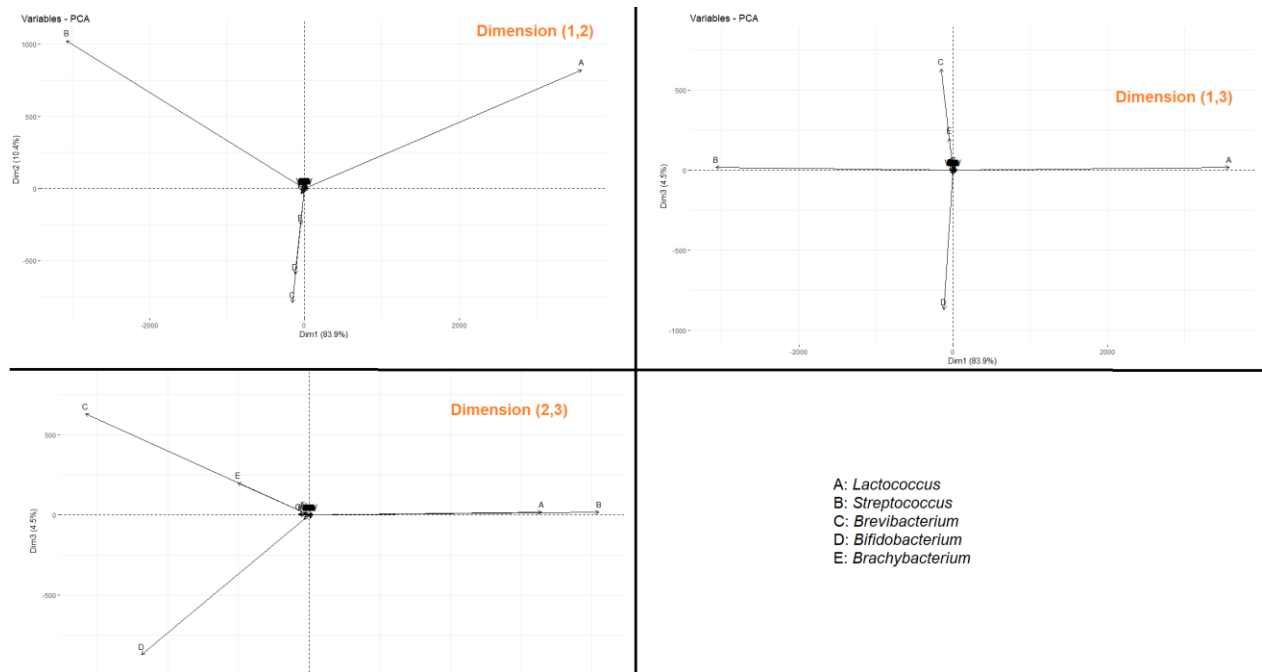
Figure 20: Graphiques des valeurs propres sans masquage (gauche) et avec masquage (droite).

Chaque axe permet d'expliquer une certaine part de la variance totale, exprimée en pourcentage (%). Les parts d'informations pour chaque axe sont reprises dans le Tableau 18. Au total, 98,80 % (sans masquage) et 99,20 % (avec masquage) de la variance sont expliqués par les axes conservés.

Tableau 18: Part d'information exprimé en pourcentage apporté par les axes retenus sans masquage et avec masquage.

| Axe   | Sans masquage (%) | Avec masquage (%) |
|-------|-------------------|-------------------|
| Axe 1 | 83,90             | 47,70             |
| Axe 2 | 10,40             | 45                |
| Axe 3 | 4,50              | 3,90              |
| Axe 4 | -                 | 2,60              |
| Total | 98,80             | 99,20             |

La position d'un individu, donc d'un fromage, au sein de l'espace multidimensionnel créé par les composantes principales peut être expliquée par les variables représentées par la Figure 21. Par exemple, la présence d'un individu le premier cadran du plan formé par les dimensions 1 et 2 peut être corrélée à la présence de *Lactococcus* (A). Dans le second cadran sont retrouvés les fromages présentant notamment les bactéries du genre *Streptococcus* (B). Enfin, dans le troisième cadran, la présence est liée aux genres *Brevibacterium*, *Bifidobacterium* et *Brachyбактерium* (C, D et E, respectivement).



**Figure 21: Graphe des variables (genres bactérien) selon les différentes composantes retenues sans masquage. La variable A représente *Lactococcus*, B est *Streptococcus*, C : *Brevibacterium*, D : *Bifidobacterium* et E : *Brachyбактерium*.**

La position des individus sans masquage de *Lactococcus* et *Streptococcus* dans les dimensions 1 et 2 est montrée dans la Figure 22. Les individus représentés en orange sont les échantillons de fromages frais (F), tandis que les fromages à pâte molle (M) et à pâte pressée (P) sont repris en vert et en bleu, respectivement. Deux groupes d'individus se distinguent. Ainsi, sur la gauche de la Figure 22, un premier groupe de quatre échantillons de fromages à pâte molle et de neuf échantillons de fromages à pâte pressée est visible. Le second groupe, à droite, comprend un mélange de fromages frais (18 individus), de pâtes molles (13 individus) et de pâtes pressées (22 individus). Ces deux groupes ont tendance à être corrélés avec la présence de *Lactococcus* ou *Streptococcus*. Une autre observation à mettre en avant : tous les échantillons de fromages frais sont regroupés. Ceci peut s'expliquer par un processus d'affinage absent par rapport aux deux autres types de fromage, et donc par une microflore résidente extrêmement homogène. Afin de confirmer cette théorie, une ACP avec masquage sera proposée par la suite.

Certains individus s'écartent de ces deux groupes : 4 échantillons de fromages à pâte molle et 2 individus de fromages à pâte pressée (Figure 22). L'individu n°22 est un fromage à pâte molle qui comporte à la fois des *Bifidobacterium* et des *Streptococcus*, ce qui explique sa position plus centrale. Les individus 47 et 48 (fromages à pâte molle) sont positionnés en corrélation avec la tendance de *Bifidobacterium*. Ceci s'explique par un nombre de *reads* plus élevé dans ce genre bactérien. L'individu 49 (fromage à pâte pressée) est en corrélation avec le genre *Brevibacterium*. Les échantillons 47 et 48 appartiennent au même lot de fromage. Donc la troisième répétition (le n°46) devrait figurer avec eux. Mais, lors du séquençage, la majorité des *reads* (plus de 80 %) a été attribuée à *Lactococcus*. Pour l'échantillon 49, celui-ci est la seule répétition du lot de fromage à figurer en corrélation avec *Brevibacterium*. C'est un fromage à pâte pressée. *Brevibacterium* est un genre associé à la croûte des fromages. Lors des prises d'échantillons, il n'est pas impossible que la proportion de croûte et de cœur prélevée soit systématiquement la même pour tous les réplicats, ce qui pourrait expliquer certaines variations au niveau des AR des micro-organismes identifiés. Cette explication peut également être valable lorsque les trois répétitions d'un même lot s'écartent dans l'espace.

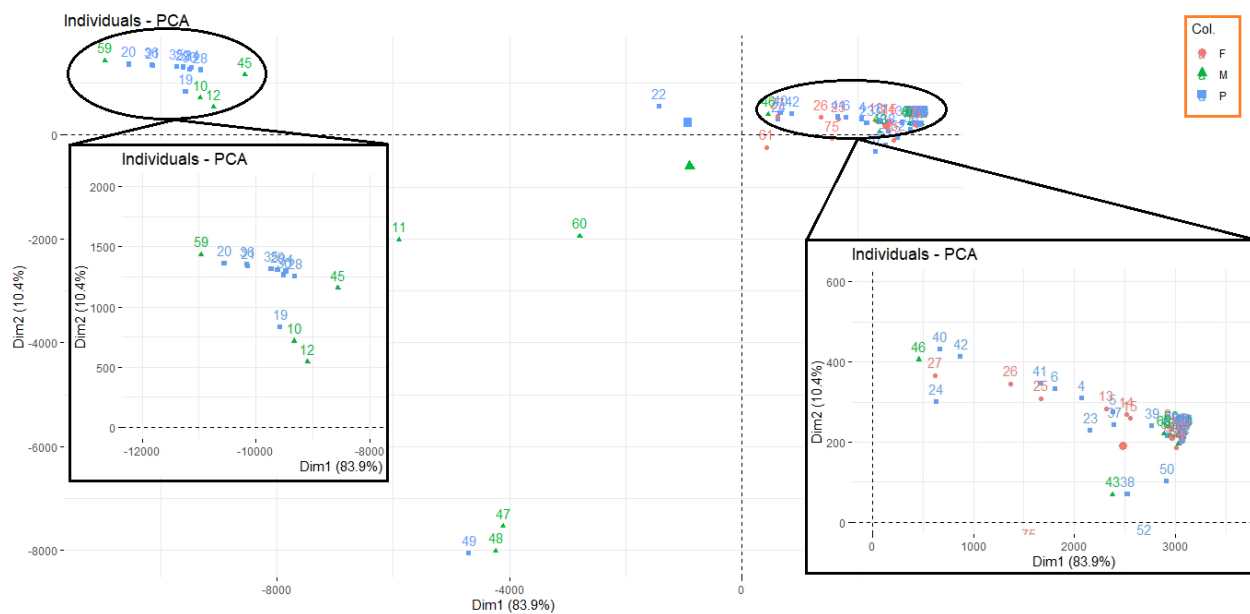
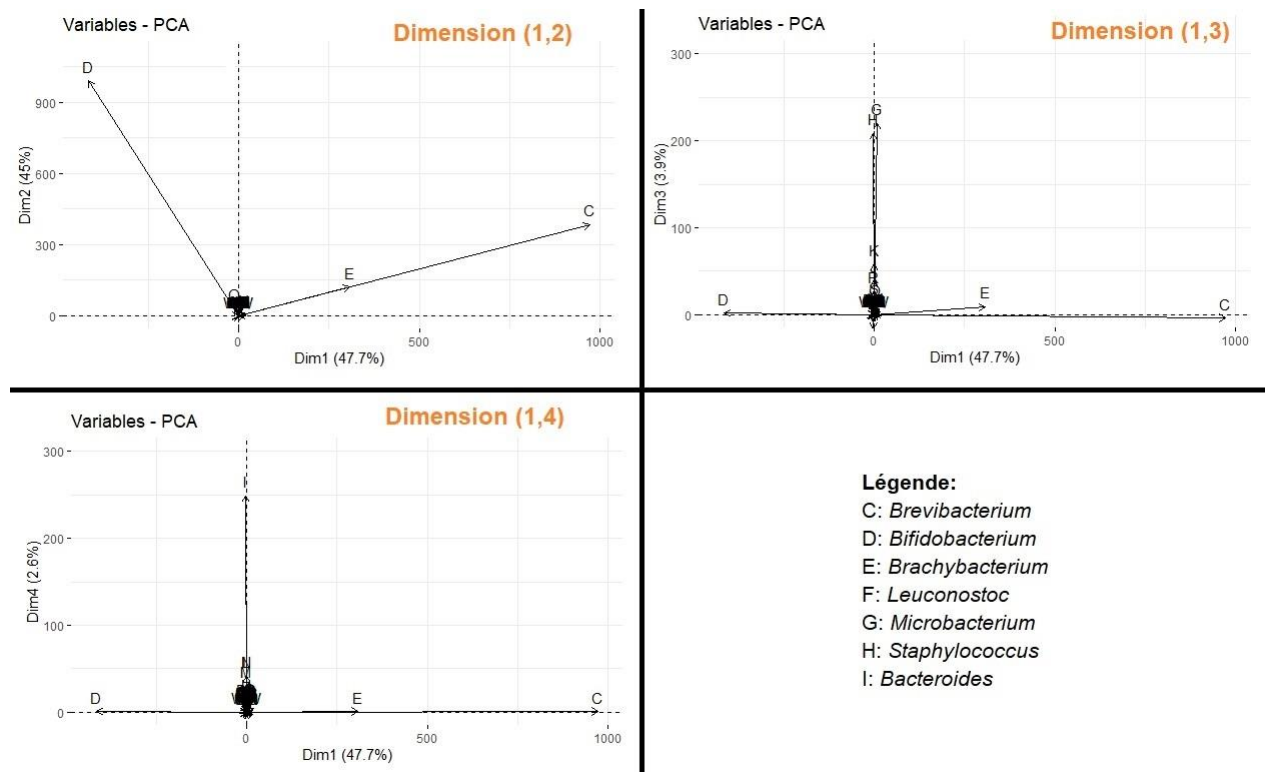


Figure 22: Position des individus sans masquage dans les dimensions 1 et 2. Les individus en orange représentent les fromages frais, les pâtes molles sont représentées en vert et les pâtes pressées en bleu.

En masquant *Lactococcus* et *Streptococcus*, le graphe des variables est modifié. La Figure 23 suivante présente les dimensions (1,2), (1,3) et (1,4). Ces graphes résument la répartition des variables. Il n'est pas nécessaire de présenter les autres plans factoriels car ils n'apportent pas d'informations supplémentaires.



**Figure 23: Graphe des variables avec masquage selon les dimensions 1, 2, 3 et 4. Les variables suivantes représentent un genre bactérien : C : *Brevibacterium*, D : *Bifidobacterium*, E : *Brachybacterium*, F : *Leuconostoc*, G : *Microbacterium*, H : *Staphylococcus* et I : *Bacteroides*.**

En observant les figures des individus (Figure 24, Figure 25 et Figure 26), il est difficile de former des groupes d'individus communs ou de distinguer des groupes d'individus différents selon le type de fromage. Cependant, quelques individus s'écartent de la tendance générale.

Dans la Figure 24, trois individus sortent du lot : 19 (fromage à pâte pressée), 43 (fromage à pâte molle) et 57 (fromage à pâte pressée). Les individus 43 et 57 se trouvent régulièrement dans le même cadran du graphe. Ceux-ci suivent la tendance expliquée par le genre *Bifidobacterium* (variable D). Ce genre bactérien est associé à un probiotique utilisé dans les élevages pour diminuer le risque de maladies pathogènes (Ceugniz et al., 2017).

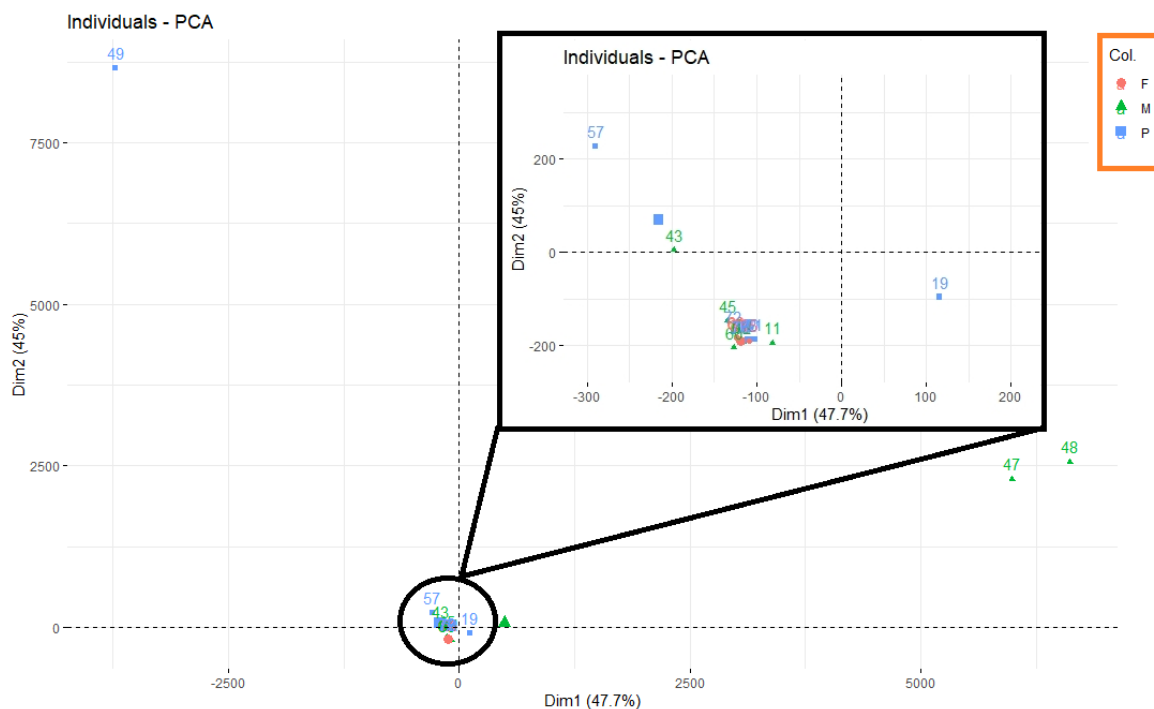


Figure 24: Graphe des individus avec masquage dans les dimensions 1 et 2. Les individus en orange représentent les fromages frais, les pâtes molles sont représentées en vert et les pâtes pressées en bleu.

Sur la Figure 25, les trois répétitions d'un lot de fromage à pâte pressée se trouvent en dehors du nuage d'individus concentrés : 22 à 24. Cela s'explique par la présence de la présence de *Staphylococcus* et *Corynebacterium* au sein de ces échantillons.

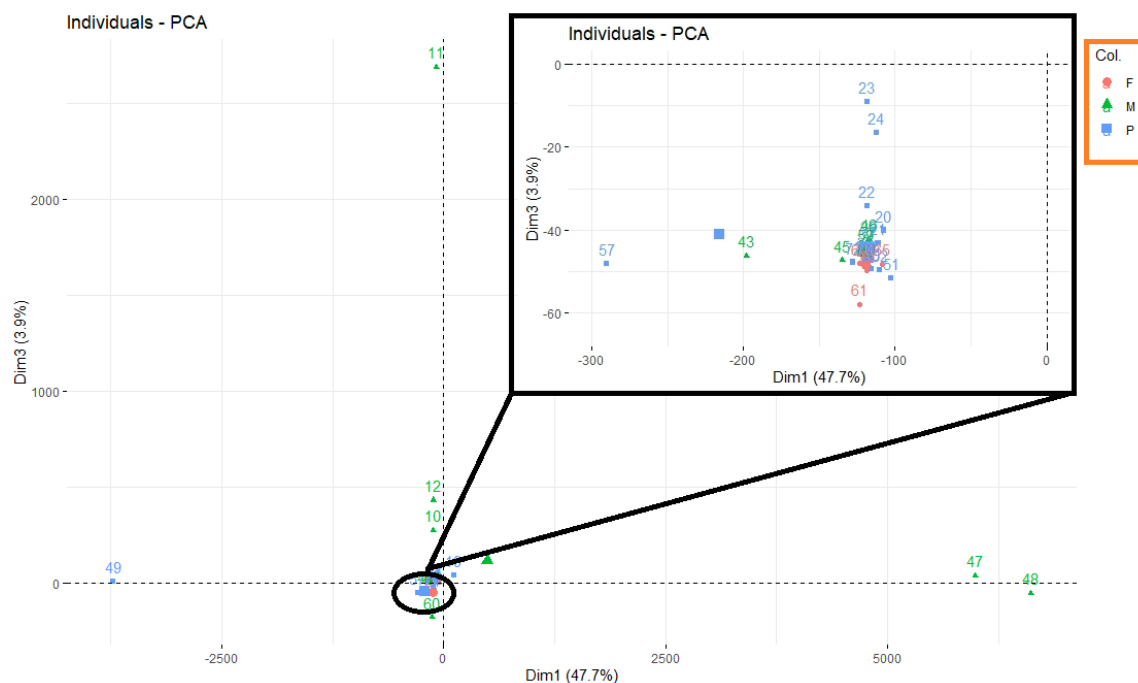
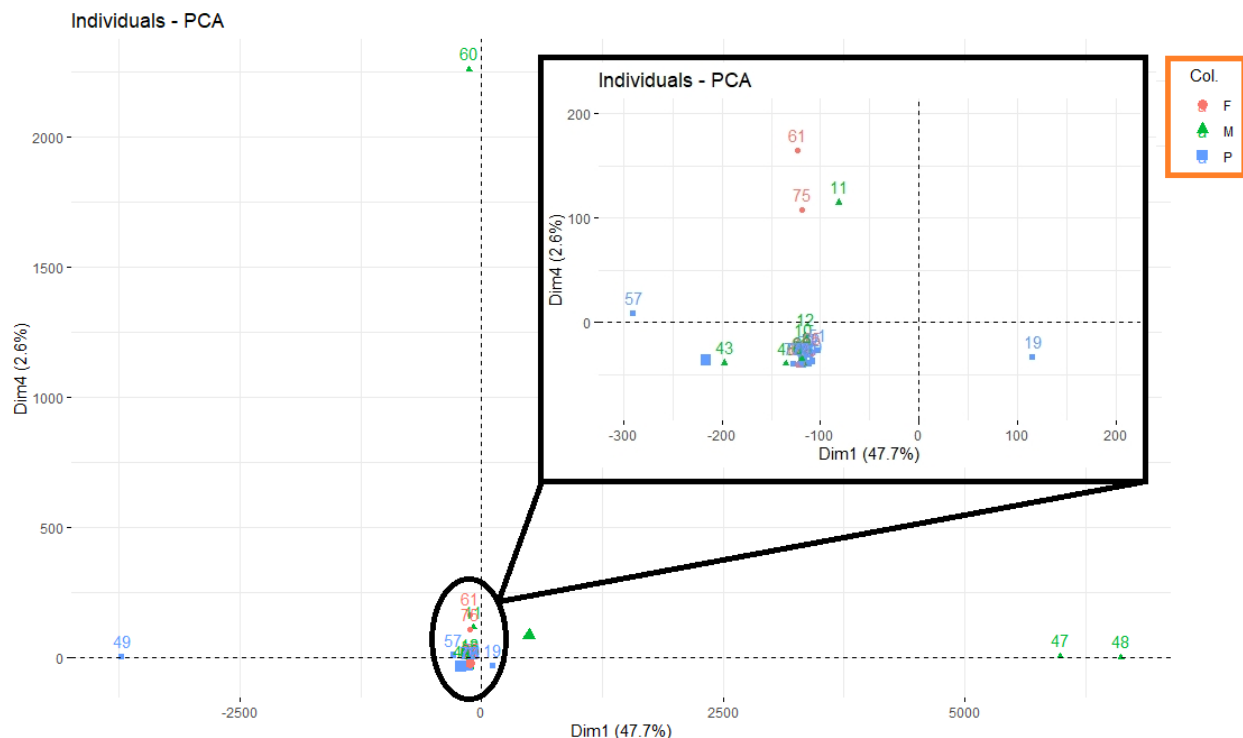


Figure 25: Graphe des individus avec masquage dans les dimensions 1 et 3. Les individus en orange représentent les fromages frais, les pâtes molles sont représentées en vert et les pâtes pressées en bleu.



L'échantillon 11 (fromage à pâte molle) sur la Figure 25 et la Figure 26 est en corrélation avec les genres *Microbacterium* et *Staphylococcus* (variables G et H) dans le plan formé par les dimensions 1 et 3 (Figure 23). C'est la seule répétition du lot ayant une présence de ces deux genres de façon plus abondante (environ 20,00 % d'AR). En effet, ces deux genres sont également présents dans les autres répétitions, mais à moins de 3,00 % d'AR. Il serait intéressant de préciser ces résultats avec des analyses complémentaires. En effet, la variable I est principalement expliquée par la quatrième dimension, qui ne représente que de 2,9 % de la variabilité. Ensuite, l'individu 60 sur la Figure 26 est une répétition d'un lot d'un fromage à pâte molle au lait cru. Selon la Figure 23, l'individu est en corrélation avec la variable I (*Bacteroides*). Ce genre bactérien figure parmi la population minoritaire des fromages au lait cru et peut être retrouvé en surface des fromages affinés. Cependant, ce genre bactérien est aussi associé à des contaminations fécales du lait. Afin de confirmer une des hypothèses émises, il serait intéressant d'analyser le fromage en distinguant la surface et le cœur, ainsi que le lait cru utilisé pour sa production, ce qui permettrait de détecter une éventuelle contamination fécale.



**Figure 26: Graphe des individus avec masquage dans les dimensions 1 et 4. Les individus en orange représentent les fromages frais, les pâtes molles sont représentées en vert et les pâtes pressées en bleu.**

Sur la Figure 26, les individus 61 et 74, deux fromages frais, se distinguent des autres produits du même type. Ceci peut être expliqué par un nombre de reads plus important attribué au genre *Leuconostoc* pour l'échantillon 61 et au genre *Bacteroides* pour l'individu 75.

Il est difficile d'établir des tendances claires et précises à cause de la dominance de *Lactococcus* et *Streptococcus*. De plus, des contaminations fécales seraient présentes,

notamment identifiables par la présence des genres *Bifidobacterium* et *Bacteroides*. Il serait intéressant d'établir une seconde analyse bio-informatique en masquant les bactéries lactiques pour avoir une meilleure idée sur la diversité microbienne au sein des échantillons.

#### 4.4.2. Analyse sur les OTUs

Les analyses suivantes sont effectuées sur la table des OTUs obtenue après analyse bio-informatique. Dans un premier temps, au sein des différents types de fromages, de lait et selon l'animal, une analyse moléculaire de la variance (AMOVA) ainsi qu'une étude d'homogénéité des populations (HOMOVA) ont été appliquées. L'AMOVA permet de déterminer s'il existe une différence significative génétique entre deux populations. L'HOMOVA détermine s'il existe entre deux populations une différence d'homogénéité génétique.

Il n'existe pas de différence significative entre les populations parmi les échantillons de fromages à pâtes molles et à pâtes pressées ( $p$ -valeur = 0,176). Cependant, entre les autres types de fromages, donc entre frais et pâtes molles ( $p$ -valeur = 0,022) et entre frais et pâtes pressées ( $p$ -valeur = 0,011), des différences significatives ont été mises en évidence. Ces conclusions sont intéressantes. En mettant en parallèle avec le nombre de genres obtenus pour chaque type, le nombre de genres est similaire dans les fromages frais et fromages à pâte molle. Ce test confirme la présence d'une différence entre ces deux types de fromage.

En ce qui concerne l'homogénéité des populations génétiques, une différence significative est soulignée entre les fromages frais et à pâte pressée ( $p$ -valeur < 0,001) ainsi qu'entre les fromages frais et les pâtes molles ( $p$ -valeur = 0,025).

Selon le type de lait utilisé (cru ou pasteurisé), il existe une différence entre les populations ( $p$ -valeur = 0,014 pour le test AMOVA), mais également d'un point de vue homogénéité génétique pour les deux types de lait ( $p$ -valeur = 0,011). Ces conclusions sont logiques en observant le nombre de genres au sein des fromages au lait cru (54) et lait pasteurisé (10).

Selon l'origine animale du lait, une différence sur la variance moléculaire n'existe pas entre les fromages à base de lait de vache et de lait de chèvre. Il existe cependant une différence significative entre les fromages au lait de chèvre et brebis ( $p$ -valeur = 0,036) et entre les fromages à base de lait de vache et de brebis ( $p$ -valeur = 0,018). D'un point de vue homogénéité des populations génétiques, les conclusions sont similaires. Ici le nombre de genres bactérien n'explique pas l'absence de différence entre les fromages au lait de vache et lait de chèvre. Ceci pourrait par exemple être lié aux OTUs non identifiés et, par conséquent, non attribués précisément.

## 5. Conclusion

---

L'objectif principal du travail était, dans un premier temps, d'étudier la communauté bactérienne au sein des fromages fermiers à la sortie de production. Cette dernière a été étudiée par métagénomique.

Après analyse, 256 genres appartenant à 6 phyla (*Actinobacteria*, *Bacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* et *Synergistetes*.) ont pu être identifiés. Afin de faciliter la présentation, seuls les genres représentant plus de 0,1 % des reads ont été retenus et discutés. Au sein des 26 fromages à base de lait cru ou pasteurisé d'origine animale différente (vache, brebis et chèvre), 11 genres bactériens ont été conservés. En masquant *Lactococcus* et *Streptococcus*, les genres dominants dans tous les échantillons, le nombre de genres représentant plus de 0,1 % des reads grimpe à 44. En considérant les fromages frais, à pâte molle, et à pâte pressée, le nombre de genres sans masquage est respectivement de 5, 17 et 10. Avec masquage, les nombres augmentent à 72, 40 et 29 genres bactériens présentant une AR supérieure à 0,10 %. Selon le type de lait, cru ou pasteurisé, sans masquage le nombre de genres sont respectivement de 11 et 4, et de 43 et 51 avec masquage des deux genres dominants. En ce qui concerne l'origine animale du lait, vache, brebis et chèvre, sans masquage le nombre de genres bactériens s'élève à 11, 3 et 5, respectivement. Lorsque *Lactococcus* et *Streptococcus* sont masqués, les genres sont de 41, 59 et 34.

Les principaux genres présents au sein des échantillons proviennent des ferments lactiques ajoutés pour la production de fromage tels que : *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Brevibacterium*. À l'exception du dernier genre, il s'agit de bactéries lactiques transformant le lactose en lactate, provoquant une diminution de pH durant l'étape de caillage. *B. linens*, appelé ferment rouge, est un ferment d'affinage impliqué dans la coloration de la croûte du fromage.

La présence de certains genres bactériens est évidente selon les types de fromages, par exemple *Brachybacterium* ou *Microbacterium*, rencontrés dans les fromages à pâte molle. À la surface des fromages figurent *Corynebacterium*, *Prevotella* ou *Brachybacterium*. Ces micro-organismes ont un rôle dans l'affinage du fromage. La présence de certains genres est directement liée à l'utilisation de certains produits lors de l'élevage des animaux ou lors de la production du fromage. Par exemple, *Bifidobacterium* et *Megasphaera* sont considérés comme des probiotiques en élevage. Le premier est utilisé pour éviter des maladies pathogènes dans l'élevage, et le second pour augmenter le rendement en lait. *Pseudoalteromonas*, *Hafnia*, *Halomonas* et *Marinilactibacillus* sont des genres bactériens présents dans le sel marin utilisé dans les saumures pour le salage du fromage. *Faecalibacterium* et *Psychrobacter* apportent des composés sensoriels impactant les propriétés organoleptiques du produit. La présence de certains genres peut être également liée au type de lait. *Faecalibacterium* et *Bifidobacterium* sont naturellement présents dans le lait cru. *Megasphaera* est présent dans les fromages à base de lait de brebis. Des genres bactériens associés à des contaminations fécales sont également présents au sein des

échantillons : *Bifidobacterium* et *Bacteroides*. La présence de contamination due au matériel ou l'environnement de production est également possible à cause d'un genre non identifié de la famille Enterobacteriaceae. Des micro-organismes potentiellement pathogènes sont également présents : *Staphylococcus*, *Campylobacter* et *Escherichia*. Cependant, les deux derniers sont présents à des AR inférieures à 0,01% dans un seul échantillon de fromage.

La biodiversité a été déterminée au moyen de différents indices : richesse, indices de Shannon, de Simpson, Chao1. Aucune différence significative n'a pu être détectée en comparant la richesse et la diversité des échantillons, selon le type de fromage, le type de lait, ou l'origine du lait.

La diversité  $\beta$  est étudiée via l'analyse à composante principale. Cette étude n'a pas permis de distinguer les types de fromages en fonction de leur communauté microbienne, mais a tout de même pu mettre en avant des tendances selon les genres pour certains fromages. Les variables explicatives qui avaient le plus de poids étaient les genres bactériens suivants : *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Brevibacterium*, *Bifidobacterium*, *Brachybacterium*, *Leuconostoc*, *Microbacterium*, *Staphylococcus* et *Bacteroides*.

L'analyse sur les variances moléculaire (AMOVA) a mis en avant une différence significative entre les fromages frais et les pâtes molles, ainsi qu'entre les fromages frais et pâtes pressées. De plus, des différences significatives entre le type de lait utilisé et entre les fromages au lait de chèvre et de brebis ont été relevées.

En ce qui concerne l'homogénéité des populations génétiques, une différence significative est soulignée entre les fromages frais et à pâte pressée, ainsi qu'entre les fromages frais et à pâte molle. Une différence d'homogénéité est également détectée selon le type de lait, et entre les fromages au lait de chèvre et brebis.

Attention toutefois que le fait de ne pas avoir une assignation précise pour certains OTUs (genres ou espèce non identifiés) peut biaiser certaines de ces conclusions.

Un objectif secondaire a été d'évaluer les caractéristiques physico-chimiques de ces fromages fermiers belges. Les fromages frais, à pâte molle et à pâte pressée ont respectivement pour pH les valeurs moyennes suivantes :  $4,44 \pm 0,16$ ,  $5,63 \pm 0,57$  et  $5,74 \pm 0,19$ . Leurs activités d'eau moyennes sont respectivement  $0,99 \pm 0,00$ ,  $0,97 \pm 0,01$  et  $0,96 \pm 0,01$ . Ces valeurs sont du même ordre que les données citées dans la littérature.

Ces premiers résultats seront par la suite mis en corrélation avec l'étude physico-chimique sur les échantillons et la croissance de *Listeria monocytogenes* détectés dans ces mêmes types de fromage à la date limite de consommation (DLC).

Pour prolonger la présente étude, il serait intéressant d'augmenter le nombre d'échantillons par type de fromage, type de lait et selon l'origine animale, et surtout d'équilibrer les proportions afin de rendre plus homogène l'étude. Il serait également judicieux d'effectuer des tests microbiologiques sur milieu de culture en parallèle afin de confirmer ou d'infirmer la présence des pathogènes ou des contaminants fécaux. En cas de

présence, il conviendrait d'effectuer les dénombrements requis pour évaluer le respect des critères microbiologiques relatifs aux fromages. D'autre part, une autre idée pourrait être de réitérer la constitution des librairies Illumina en utilisant une technique permettant de ne pas amplifier l'ADN des principales bactéries lactiques. Ceci pourrait permettre d'avoir une vision plus approfondie des sous-dominantes et minoritaire. Etendre l'étude aux champignons et aux levures permettrait une meilleure compréhension de l'environnement microbien des fromages. Le cœur et la croûte du fromage constituent deux environnements physico-chimiques différents, ayant chacun un impact sur la flore rencontrée. Il serait également judicieux de distinguer ces deux parties dans une prochaine étude. Afin d'élargir les connaissances sur les facteurs influençant la croissance des micro-organismes pathogènes, il serait intéressant d'étudier l'évolution de la flore au cours de la conservation des fromages. Ainsi, ces résultats permettraient de renforcer encore la sécurité sanitaire des aliments.

## 6. Bibliographie

---

- AFSCA, 2015. Evaluation des risques microbiologiques de la consommation des produits laitiers à base de lait cru (dossier Sci Com 2014/06: auto-saisine)., 1-43.
- Akrami-Mohajeri F., Derakhshan Z., Ferrante M., Hamidiyan N., Soleymani M., Conti G.O. & Tafti R.D., 2018. The prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp in raw milk and traditional dairy products delivered in Yazd, central Iran (2016). *Food Chem. Toxicol.* **114**(January), 141-144.
- Almena-Aliste, Montserrat Miettton B., 2014. The microbiology of traditional hard and semihard cooked mountain cheeses. *Microb. Spectr.* 1-29.
- Andrén A., 2011. Rennets and Coagulants. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, 574-578.
- ANSES, 2011a. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments: *Campylobacter jejuni* - *Campylobacter coli*. *anses* **79**(1), 358.
- ANSES, 2011b. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments: *Listeria monocytogenes*. *ANSES* 1-17.
- Ardö Y., McSweeney P.L.H., Magboul A.A.A., Upadhyay V.K. & Fox P.F., 2017. Biochemistry of Cheese Ripening: Proteolysis. In: *Cheese*. Elsevier, 445-482.
- Ayerbe A. & Maubois J.-L., 2018. Ecosystèmes d'acidification et d'affinage et valeur santé des fromages. In: *Le fromage*. 879-882.
- Bachmann H.-P., Fröhlich-Wyder M.-T., Jakob E., Roth E., Wechsler D., Beuvier E. & Buchin S., 2011. Raw Milk Cheeses. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, 652-660.
- Bissett A. & Brown M. V., 2018. Alpha-diversity is strongly influenced by the composition of other samples when using multiplexed sequencing approaches. *Soil Biol. Biochem.* **127**(June), 79-81.
- Botha A. & Botes A., 2014. Geotrichum. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, 88-93.
- Boutrou R. & Guéguen M., 2005. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *Int. J. Food Microbiol.* **102**(1), 1-20.
- Boutrou R., Kerriou L. & Gassi J., 2006. Contribution of *Geotrichum candidum* to the proteolysis of soft cheese. *Int. Dairy J.* **16**(7), 775-783.
- Brisabois A., Lafarge V., Brouillaud A., de Buyser M.-L., Collette C., Garin-Bastuji B. & Thore M.-F., 2016. Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : situation en France et en Europe. *Rev. Sci. Tech. l'OIE* **16**(2), 452-471.
- Carugati L., Corinaldesi C., Dell'Anno A. & Danovaro R., 2015. Metagenetic tools for the census of marine meiofaunal biodiversity: An overview. *Mar. Genomics* **24**, 11-20.
- Ceugniet A., Taminiau B., Coucheney F., Jacques P., Delcenserie V., Daube G. & Drider D., 2017. Use of a metagenetic approach to monitor the bacterial microbiota of "Tomme d'Orchies" cheese during the ripening process. *Int. J. Food Microbiol.* **247**, 65-69.
- Chakravorty S., Helb D., Burday M., Connell N. & Alland D., 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods* **69**(2), 330-339.

- Chatelard-Chauvin C., Pelissier F., Hulin S. & Montel M.C., 2015. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw milk Cantal type cheeses during cheese making, ripening and storage in different packaging conditions. *Food Control* **54**, 53-65.
- Choi K.-H., Lee H., Lee S., Kim S. & Yoon Y., 2016. Cheese Microbial Risk Assessments — A Review. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* **29**(3), 307-314.
- Cogan T.M., 2011. Bacteria, Beneficial | *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium aurantiacum* and Other Smear Microorganisms. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, 395-400.
- Corsetti A., Rossi J. & Gobbetti M., 2001. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* **69**(1-2), 1-10.
- Cotter P.D. & Beresford T.P., 2017. Microbiome Changes During Ripening. In: *Cheese*. Elsevier, 389-409.
- Crump J.A. & Wain J., 2017. Salmonella. *Int. Encycl. Public Heal.* **6**, 425-433.
- Delcenserie V., Gavini F., China B. & Daube G., 2011. Bifidobacterium pseudolongum are efficient indicators of animal fecal contamination in raw milk cheese industry. *BMC Microbiol.* **11**(1), 178.
- Delcenserie V., Taminiau B., Delhalle L., Nezer C., Doyen P., Crevecoeur S., Roussey D., Korsak N. & Daube G., 2014. Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. *J. Dairy Sci.* **97**(10), 6046-6056.
- Deng Y.F., Wang Y.J., Zou Y., Azarfar A., Wei X.L., Ji S.K., Zhang J., Wu Z.H., Wang S.X., Dong S.Z., Xu Y., Shao D.F., Xiao J.X., Yang K.L., Cao Z.J. & Li S.L., 2017. Influence of dairy by-product waste milk on the microbiomes of different gastrointestinal tract components in pre-weaned dairy calves. *Sci. Rep.* **7**(1), 42689.
- Desmaures N., 2014. *Mold-Ripened Varieties*, Encyclopedia of Food Microbiology, Elsevier, 409–415.
- Desmaures N. & Irlinger F., 2018. microorganismes d'affinage: levure, moisissures et bactéries. In: *Le fromage*.
- Diene S.M., Bertelli C., Pillonel T., Schrenzel J. & Greub G., 2014. Génomique et métagénomique bactériennes: applications cliniques et importance médicale. *Rev. Med. Suisse* **10**(450), 2155-2161.
- DiversiFerm, 2014. À Propos Du Lait Cru ....
- Downes J., Vartoukian S.R., Dewhirst F.E., Izard J., Chen T., Yu W.-H., Sutcliffe I.C. & Wade W.G., 2009. *Pyramidobacter piscicola* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum « Synergistetes » isolated from the human oral cavity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**(5), 972-980.
- DSM, août-1-2019. Thiamin. [https://www.dsm.com/markets/anh/en\\_US/Compendium/ruminants/thiamin.html](https://www.dsm.com/markets/anh/en_US/Compendium/ruminants/thiamin.html), (01/08/2019).
- Dugat-Bony E., Garnier L., Denonfoux J., Ferreira S., Sarthou A.-S., Bonnarne P. & Irlinger F., 2016. Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *Int. J. Food Microbiol.* **238**, 265-273.
- Dusterhoft E.-M., Engels W. & Huppertz T., 2017. Salting of Cheese. In: *Reference Module in Food Science*. Elsevier, 1-5.

- Düsterhöft E.-M., Engels W. & Huppertz T., 2017. Gouda and Related Cheeses. *In: Cheese*. Elsevier, 865-888.
- EFSA, 2006. La campylobactériose passe devant la salmonellose. C'est l'infection animale transmise à l'homme la plus souvent rapportée dans l'UE. <https://www.efsa.europa.eu/fr/press/news/061214>, (29/05/2019).
- EFSA, 2015. Les infections à Campylobacter et Listeria toujours en hausse dans l'UE – déclarent l'EFSA et l'ECDC. <https://www.efsa.europa.eu/fr/press/news/151217>, (27/05/2019).
- EFSA, 2017. Les cas de salmonellose ne diminuent plus dans l'UE. <https://www.efsa.europa.eu/fr/press/news/171212>, (27/05/2019).
- EFSA & ECDC, 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA J.* **16**(12).
- Eliskases-Lechner F., Gueguen M. & Panoff J.M., 2011. Geotrichum candidum. *In: Yeasts and Molds*. 765-771.
- Everett D.W. & Auty M.A.E., 2017. Cheese Microstructure 1. *In: Cheese*. Elsevier, 547-569.
- Fagan C.C., O'Callaghan D.J., Mateo M.J. & Dejmek P., 2017. The Syneresis of Rennet-Coagulated Curd. *In: Cheese*. Elsevier, 145-177.
- Falardeau J., Keeney K., Trmčić A., Kitts D. & Wang S., 2019. Farm-to-fork profiling of bacterial communities associated with an artisan cheese production facility. *Food Microbiol.* **83**(March), 48-58.
- FAO/OMS, 2005. FAO/WHO Regional Meeting on Food Safety for the Near East. <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/Meeting/009/y6024e/y6024e01.pdf>
- FAO, 2019. Gateway to dairy production and products. <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/milk-composition/en/>
- FAO, mars-19-2019. Enteric infection due to Salmonella and Campylobacter. <http://www.fao.org/3/y5516e/y5516e05.htm>, (19/03/2019).
- Farkye N.Y. & Guinee T.P., 2017. Low-Fat and Low-Sodium Cheeses. *In: Cheese*. Elsevier, 699-714.
- Fox P.F., Cogan T.M. & Guinee T.P., 2017. Factors That Affect the Quality of Cheese. *In: Cheese*. Elsevier, 617-641.
- Fox P.F. & McSweeney P.L.H., 2017. Cheese: An Overview. *In: Cheese*. Elsevier, 5-21.
- Frétin M., Martin B., Rifa E., Isabelle V.M., Pomiès D., Ferlay A., Montel M.C. & Delbès C., 2018. Bacterial community assembly from cow teat skin to ripened cheeses is influenced by grazing systems. *Sci. Rep.* **8**(1), 1-11.
- Frisvad J.C., 2014. PENICILLIUM | Penicillium/Penicillia in Food Production. *In: Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, 14-18.
- Fröhlich-Wyder M.-T., Bisig W., Guggisberg D., Jakob E., Turgay M. & Wechsler D., 2017. Cheeses With Propionic Acid Fermentation. *In: Cheese*. Elsevier, 889-910.
- Gagnaire V., Spinnler E. & Thierry A., 2018. Biochimie de l'affinage: les phénomènes enzymatiques et microbiens. *In: Le fromage*. 429-466.
- Gassi J. & Schuck P., 2017. Partie 1: Procédés de transformation fromagère **33**(partie 3), 1-11.



- Gaucheron F., 2018. Micelles de caséines et dynamique ionique. *In: Le fromage*. 96-135.
- Gelsomino R., Goerges S., Vancanneyt M., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Scherer S., Swings J., Fitzgerald G.F. & Cogan T.M., 2005. Surface Microflora of Four Smear-Ripened Cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(11), 6489-6500.
- 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. *Int. J. Dairy Technol.* **71**(4), 825-843.
- Gobbetti M., Neviani E. & Fox P., 2018. *The Cheeses of Italy: Science and Technology*, The Cheeses of Italy: Science and Technology, Springer International Publishing, Cham, 1-274.
- Goudédranche H., Camier-Coudron B., Gassi J.-Y. & Schuck P., 2017a. Partie 2: Procédés de transformation fromagère **33**(partie 2).
- Goudédranche H., Camier-Coudron B., Gassi J.-Y. & Schuck P., 2017b. Partie 3: Procédés de transformation fromagère **33**(partie 3).
- Guetouache M., Guessas, Bettache, Medjekal & Samir, 2014. Composition and nutritional value of raw milk. *Issues Biol. Sci. Pharm. Res.* **2**(10), 115-122.
- Guinee T.P. & Fox P.F., 2017. Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. *In: Cheese*. Elsevier, 317-375.
- Hayaloglu A.A., 2016. Cheese: Microbiology of Cheese. *In: Reference Module in Food Science*. Elsevier, 625-631.
- Hayaloglu A.A., 2017. Cheese Varieties Ripened Under Brine. *In: Cheese*. Elsevier, 997-1040.
- Holschbach C.L. & Peek S.F., 2018. Salmonella in Dairy Cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **34**(1), 133-154.
- Horne D.S. & Lucey J.A., 2017. Rennet-Induced Coagulation of Milk. *In: Cheese*. Elsevier, 115-143.
- Huppertz T., Fox P.F. & Kelly A.L., 2018. The caseins: Structure, stability, and functionality. *In: Proteins in Food Processing*. Elsevier, 49-92.
- Irlinger F., Bimet F., Delettre J., Lefèvre M. & Grimont P.A.D., 2005. *Arthrobacter bergerei* sp. nov. and *Arthrobacter arilaitensis* sp. nov., novel coryneform species isolated from the surfaces of cheeses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**(1), 457-462.
- Irlinger F., Helinck S. & Jany J.L., 2017. Secondary and Adjunct Cultures. *In: Cheese*. Elsevier, 273-300.
- J. D'Amico D. & Donnelly C.W., 2017. Growth and Survival of Microbial Pathogens in Cheese. *In: Cheese*. Elsevier, 573-594.
- Jackson S.A. & Dobson A.D.W., 2016a. Yeasts and Molds: *Penicillium roqueforti*. *In: Reference Module in Food Science*. Elsevier, 772-775.
- Jackson S.A. & Dobson A.D.W., 2016b. Yeasts and Molds: *Penicillium camemberti*. *In: Reference Module in Food Science*. Elsevier, 1-4.
- Janda J.M. & Abbott S.L., 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* **45**(9), 2761-2764.
- Jaros D. & Rohm H., 2017. Rennets: Applied Aspects. *In: Cheese*. Elsevier, 53-67.

- Jeantet R. & Croguennec T., 2018. Eléments de biochimie laitière. *In: Le fromage*. 77-96.
- Jerónimo E. & Malcata F.X., 2016. Cheese: Composition and Health Effects. *In: Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, 741-747.
- Johnson M.E., 2011. Cheese | Preparation of Cheese Milk. *In: Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, 544-551.
- Kergourlay G., Taminiau B., Daube G. & Champomier Vergès M.-C., 2015. Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. *Int. J. Food Microbiol.* **213**, 31-39.
- Khattab A.R., Guirguis H.A., Tawfik S.M. & Farag M.A., 2019. Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. *Trends Food Sci. Technol.* **88**(January), 343-360.
- Kongo J.M. & Malcata F.X., 2016a. Cheese: Processing and Sensory Properties. *In: Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, 748-754.
- Kongo J.M. & Malcata F.X., 2016b. Cheese: Chemistry and Microbiology. *In: Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, 735-740.
- Kuczynski J., Stombaugh J., Walters W.A., González A., Caporaso J.G. & Knight R., 2011. Using QIIME to Analyze 16S rRNA Gene Sequences from Microbial Communities. *In: Current Protocols in Bioinformatics*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 1-28.
- Lakicevic B. & Nastasijevic I., 2017. *Listeria monocytogenes* in retail establishments: Contamination routes and control strategies. *Food Rev. Int.* **33**(3), 247-269.
- Larpin-Laborde S., Imran M., Bonaïti C., Bora N., Gelsomino R., Goerges S., Irlinger F., Goodfellow M., Ward A.C., Vancanneyt M., Swings J., Scherer S., Guéguen M. & Desmasures N., 2011. Surface microbial consortia from Livarot, a French smear-ripened cheese. *Can. J. Microbiol.* **57**(8), 651-660.
- Leclercq-Perlat M.-N., Corrieu G. & Spinnler H.-E., 2004. The Color of *Brevibacterium linens* Depends on the Yeast Used for Cheese Deacidification. *J. Dairy Sci.* **87**(5), 1536-1544.
- Li N., Chu H., Qi Y., Li C., Ping X., Sun Y. & Jiang Z., 2019. Alpha and beta diversity of birds along elevational vegetation zones on the southern slope of Altai Mountains: Implication for conservation. *Glob. Ecol. Conserv.* **19**, e00643.
- Lopez-Valladares G., Danielsson-Tham M.-L. & Tham W., 2018. Implicated Food Products for Listeriosis and Changes in Serovars of *Listeria monocytogenes* Affecting Humans in Recent Decades. *Foodborne Pathog. Dis.* **15**(7), 387-397.
- Lortal S. & Falentin H., 2018. Métagénomique des fromages au lait cru et impact des procédés. *In: Le fromage*. 316-319.
- Marcon E., 2010. Mesures de la biodiversité.
- Martin B., Chilliard Y. & Ferlay A., 2018. Facteurs de variation de la qualité fromagère du lait. *In: Le fromage*. 137-156.
- Masoud W., Vogensen F.K., Lillevang S., Abu Al-Soud W., Sørensen S.J. & Jakobsen M., 2012. The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **153**(1-2), 192-202.
- Maubois J.-L., 2018. Le lait, matière première de la transformation en fromage. *In: Le fromage*.

195-208.

- McSweeney P.L.H., 2017. Biochemistry of Cheese Ripening: Introduction and Overview. *In: Cheese*. Elsevier, 379-387.
- McSweeney P.L.H., Ottogalli G. & Fox P.F., 2004. *Diversity of Cheese Varieties : An Overview*.
- McSweeney P.L.H., Ottogalli G. & Fox P.F., 2017. Diversity and Classification of Cheese Varieties: An Overview. *In: Cheese*. Elsevier, 781-808.
- Michelet T., 2012. Fabrication des fromages - Dangers , règlements et normes. **33**(0).
- Mietton B. & Chablain I., 2018. Du lait au fromage: les fondamentaux technologiques. *In: Le fromage*. 321-359.
- Montel M.-C., Buchin S., Mallet A., Delbes-Paus C., Vuitton D.A., Desmasures N. & Berthier F., 2014a. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int. J. Food Microbiol.* **177**, 136-154.
- Montel M.C., Buchin S., Mallet A., Delbes-Paus C., Vuitton D.A., Desmasures N. & Berthier F., 2014b. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int. J. Food Microbiol.* **177**, 136-154.
- Moschopoulou E., 2011. Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminants used in cheese production. *Small Rumin. Res.* **101** (1-3), 188-195.
- Mothur, juillet-22-2019a. AMOVA. <https://www.mothur.org/wiki/Amova>, (22/07/2019).
- Mothur, juillet-22-2019b. HOMOVA. <https://www.mothur.org/wiki/Homova>, (22/07/2019).
- Mounier J., Coton M., Irlinger F., Landaud S. & Bonnarne P., 2017. Smear-Ripened Cheeses. *In: Cheese*. Elsevier, 955-996.
- Mounier J., Monnet C., Vallaeys T., Arditi R., Sarthou A.S., Hélias A. & Irlinger F., 2008. Microbial interactions within a cheese microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**(1), 172-181.
- Nero L.A. & de Carvalho A.F., 2019. Challenges for Production and Consumption of Raw Milk and Raw Milk Products. *In: Raw Milk*. Elsevier, 351-362.
- Ngo J., Taminiau B., Fall P.A., Daube G. & Fontaine J., 2018. Ear canal microbiota - a comparison between healthy dogs and atopic dogs without clinical signs of otitis externa. *Vet. Dermatol.* **29**(5), 425-e140.
- O'Callaghan T.F., Sugrue I., Hill C., Ross R.P. & Stanton C., 2019. Nutritional Aspects of Raw Milk. *In: Raw Milk*. Elsevier, 127-148.
- O'Sullivan O. & Cotter P.D., 2017. Microbiota of Raw Milk and Raw Milk Cheeses. *In: Cheese*. Elsevier, 301-316.
- OMS, 2012. *The global view of campylobacteriosis: report of an expert consultation.*, 9-11.
- OMS, 2018a. Escherichia coli (E. coli). <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- OMS, 2018b. Campylobacter. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>, (29/05/2019).
- OMS, mai-27-2019. Escherichia coli (E. coli). <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>, (27/05/2019).
- Orsi R.H., Bakker H.C. de. & Wiedmann M., 2011. Listeria monocytogenes lineages: Genomics,

- evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**(2), 79-96.
- Ozturkoglu-Budak S. & De Vries R.P., 2017. *Mold-ripened and raw milk cheeses: Production, risks, and benefits to human health*, Dairy in Human Health and Disease across the Lifespan, Elsevier Inc., 353-361.
- Palm R., 2009. *L'analyse en composantes principales: Principes et applications*, Unité de Statistique, Informatique et Mathématique appliquées.
- Pan X., Xue F., Nan X., Tang Z., Wang K., Beckers Y., Jiang L. & Xiong B., 2017. Illumina sequencing approach to characterize thiamine metabolism related bacteria and the impacts of thiamine supplementation on ruminal microbiota in dairy cows fed high-grain diets. *Front. Microbiol.* **8**(SEP), 1-10.
- Panthi R.R., Jordan K.N., Kelly A.L. & Sheehan J.J. (Diarmuid), 2017. Selection and Treatment of Milk for Cheesemaking. *In: Cheese*. Elsevier, 23-50.
- Parente E., Cogan T.M. & Powell I.B., 2017. Starter Cultures: General Aspects. *In: Cheese*. Elsevier, 201-226.
- PEF-AgroAlimentaire, 2014. Le soin des fromages à croûte morgée.
- Perin L.M., Pereira J.G., Bersot L.S. & Nero L.A., 2019. The Microbiology of Raw Milk. *In: Raw Milk*. Elsevier, Hoboken, NJ, USA, 45-64.
- Peterlongo P., 2016. Lire les lectures : analyse de données de séquençage.
- Profession Fromager, 2016. La famille de fromages. <https://www.professionfromager.com/boutique/>
- Pyz-Łukasik R., Knysz P. & Gondek M., 2018. Hygiene Quality and Consumer Safety of Traditional Short- and Long-Ripened Cheeses from Poland. *J. Food Qual.* **2018**, 1-7.
- Quigley L., O'Sullivan O., Beresford T.P., Ross R.P., Fitzgerald G.F. & Cotter P.D., 2012a. High-Throughput Sequencing for Detection of Subpopulations of Bacteria Not Previously Associated with Artisanal Cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**(16), 5717-5723.
- Quigley L., O'Sullivan O., Beresford T.P., Ross R.P., Fitzgerald G.F. & Cotter P.D., 2012b. High-Throughput Sequencing for Detection of Subpopulations of Bacteria Not Previously Associated with Artisanal Cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**(16), 5717-5723.
- Ratray F.P. & Fox P.F., 1999. Aspects of Enzymology and Biochemical Properties of *Brevibacterium linens* Relevant to Cheese Ripening: A Review. *J. Dairy Sci.* **82**(5), 891-909.
- Reckhow, 2004. Chapter XVII: Light-scattering and molecular spectrophotometry. <http://www.ecs.umass.edu/cee/reckhow/courses/572/572bk17/572BK17.html>, (26/07/2019).
- Renhe I.R.T., Perrone Í.T., Tavares G.M., Schuck P. & de Carvalho A.F., 2019. *Physicochemical Characteristics of Raw Milk*, Raw Milk, Elsevier Inc., 29-43.
- Roche M., 2018. Fromages sous signe de qualité (AOP, IGP, labels conformité). *In: Peyrot, B. éd. Le fromage*. 65-74.
- Salazar J.K., Carstens C.K., Ramachandran P., Shazer A.G., Narula S.S., Reed E., Ottosen A. & Schill K.M., 2018. Metagenomics of pasteurized and unpasteurized gouda cheese using targeted 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiol.* **18**(1), 189.
- Santé Publique, 2018. Toxi-Infections Alimentaires Collectives 1-49.

- Schutz S., juin-5-2019. Introduction à la métagénomique. <http://dridk.me/metagenomique.html>, (05/06/2019).
- Seiler H., Bleicher A., Busse H.-J., Hufner J. & Scherer S., 2012. *Psychroflexus halocasei* sp. nov., isolated from a microbial consortium on a cheese. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**(Pt 8), 1850-1856.
- Spellerberg I.F., 2008. Shannon–Wiener Index. *In: Encyclopedia of Ecology*. Elsevier, 3249-3252.
- Spinnler H., 2017. Surface Mold–Ripened Cheeses. *In: Cheese*. Elsevier, 911-928.
- Statbel, 2017. La production belge de produits laitiers frais, de beurre et de fromage à la hausse. *StatBel*. <https://statbel.fgov.be/fr/nouvelles/la-production-belge-de-produits-laitiers-frais-de-beurre-et-de-fromage-la-hausse>, (11/06/2019).
- Sugrue I., Tobin C., Ross R.P., Stanton C. & Hill C., 2019. Foodborne Pathogens and Zoonotic Diseases. *In: Raw Milk*. Elsevier, 259-272.
- Taborda M., Antunes A., Tiago I., Veríssimo A., Nobre M.F. & da Costa M.S., 2009. Description of *Idiomarina insulisalsae* sp. nov., isolated from the soil of a sea salt evaporation pond, proposal to transfer the species of the genus *Pseudidiomarina* to the genus *Idiomarina* and emended description of the genus *Idiomarina*. *Syst. Appl. Microbiol.* **32**(6), 371-378.
- Uniacke-Lowe T. & Fox P.F., 2017. Chymosin, Pepsins and Other Aspartyl Proteinases: Structures, Functions, Catalytic Mechanism and Milk-Clotting Properties. *In: Cheese*. Elsevier, 69-113.
- Vignola C., 2010. *Science et technologie du lait : transformation du lait*. Polytechnique, P.I. éd., Quebec.
- Weimer P.J., Da Silva Cabral L. & Cacite F., 2015. Effects of ruminal dosing of Holstein cows with *Megasphaera elsdenii* on milk fat production, ruminal chemistry, and bacterial strain persistence. *J. Dairy Sci.* **98**(11), 8078-8092.
- Ye D. & Eastridge M.L., 2018. Oral administration of *Megasphaera elsdenii* to Jersey cows during early lactation. *Prof. Anim. Sci.* **34**(1), 67-74.
- Yoon Y., Lee S. & Choi K.H., 2016. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control* **63**, 201-215.

# Annexe

## Annexe 1 : Paramètres physico-chimiques (Concentration d'ADN, pH, $a_w$ , MG, MS, Sel, Eau) des échantillons de fromages analysés.

| Lot        | Type de fromage | Animal | Lait       | Concentration ADN (ng/ $\mu$ l) |            | pH      |            | $a_w$   |            | MG (%) | MS (%) | Sel (%) | Eau (%) |
|------------|-----------------|--------|------------|---------------------------------|------------|---------|------------|---------|------------|--------|--------|---------|---------|
|            |                 |        |            | Moyenne                         | Ecart type | Moyenne | Ecart type | Moyenne | Ecart type |        |        |         |         |
| 2018/10082 | Frais           | Vache  | Cru        | 22,55                           | 1,37       | 4,36    | 0,01       | 0,99    | 0,01       | 12,96  | 27,50  | 0,16    | 72,50   |
| 2018/10179 | Frais           | Vache  | Cru        | 25,33                           | 7,74       | 4,47    | 0,00       | 0,99    | 0,01       | 0,34   | 16,96  | 0,16    | 83,04   |
| 2018/10661 | Frais           | Vache  | Cru        | 41,08                           | 5,14       | 4,40    | 0,01       | 1,00    | 0,00       | 0,31   | 16,74  | 0,21    | 83,26   |
| 2018/12355 | Frais           | Chèvre | Cru        | 27,80                           | 4,94       | 4,35    | 0,03       | 1,00    | 0,00       | 14,87  | 30,56  | 0,29    | 69,44   |
| 2018/12692 | Frais           | Chèvre | Cru        | 30,93                           | 6,28       | 4,33    | 0,01       | 0,99    | 0,00       | 17,96  | 34,62  | 0,26    | 65,38   |
| 2018/14990 | Frais           | Vache  | Cru        | 89,85                           | 55,29      | 4,43    | 0,00       | 0,99    | 0,00       | 0,33   | 13,62  | N.A.    | 86,38   |
| 2018/09418 | Frais           | Brebis | Pasteurisé | 39,86                           | 13,70      | 4,74    | 0,28       | 0,98    | 0,01       | 30,58  | 62,74  | 2,06    | 37,26   |
| 2018/13504 | Mou             | Vache  | Pasteurisé | 78,01                           | 37,28      | 6,75    | 0,21       | 0,99    | 0,01       | 26,53  | 49,34  | 1,30    | 50,66   |
| 2018/13972 | Mou             | Vache  | Cru        | 37,01                           | 10,00      | 5,60    | 0,03       | 0,99    | 0,00       | 25,81  | 50,76  | 1,44    | 49,24   |
| 2018/15386 | Mou             | Vache  | Cru        | 26,44                           | 1,16       | 5,26    | 0,02       | 0,96    | 0,00       | 27,74  | 54,21  | 2,83    | 45,79   |
| 2018/16561 | Mou             | Vache  | Cru        | 48,33                           | 9,06       | 5,78    | 0,12       | 0,97    | 0,00       | 26,89  | 56,31  | 1,70    | 43,69   |
| 2018/17109 | Mou             | Vache  | Cru        | 41,09                           | 17,48      | 5,72    | 0,13       | 0,98    | 0,00       | 19,19  | 43,54  | 1,77    | 65,46   |
| 2018/08869 | Mou             | Vache  | Cru        | 24,85                           | 7,08       | 5,45    | 0,12       | 0,96    | 0,00       | 24,06  | 49,72  | 2,77    | 50,28   |
| 2018/09734 | Mou             | Chèvre | Cru        | 73,44                           | 84,24      | 4,83    | 0,25       | 0,98    | 0,01       | 26,26  | 49,40  | 0,92    | 50,60   |

|            |         |        |            |       |       |      |      |      |      |       |       |      |       |
|------------|---------|--------|------------|-------|-------|------|------|------|------|-------|-------|------|-------|
| 2018/10754 | Pressée | Brebis | Pasteurisé | 77,93 | 80,80 | 5,86 | 0,04 | 0,92 | 0,00 | 21,93 | 41,22 | 1,15 | 58,78 |
| 2018/10777 | Pressée | Brebis | Cru        | 41,59 | 33,47 | 5,39 | 0,04 | 0,95 | 0,00 | 30,15 | 60,77 | 1,53 | 39,23 |
| 2018/12085 | Pressée | Vache  | Pasteurisé | 21,69 | 0,44  | 5,85 | 0,02 | 0,96 | 0,01 | 34,03 | 63,54 | 1,39 | 36,46 |
| 2018/12172 | Pressée | Vache  | Cru        | 39,92 | 17,94 | 5,66 | 0,06 | 0,95 | 0,00 | 36,09 | 69,07 | 1,72 | 30,93 |
| 2018/12848 | Pressée | Vache  | Cru        | 54,76 | 17,64 | 5,92 | 0,04 | 0,96 | 0,00 | 33,11 | 61,95 | 0,89 | 38,05 |
| 2018/14761 | Pressée | Vache  | Cru        | 30,76 | 13,35 | 5,57 | 0,09 | 0,97 | 0,01 | 28,86 | 58,59 | 1,89 | 41,41 |
| 2018/14815 | Pressée | Vache  | Cru        | 25,83 | 4,61  | 5,63 | 0,05 | 0,97 | 0,00 | 27,92 | 54,21 | 1,41 | 45,79 |
| 2018/15546 | Pressée | Vache  | Cru        | 44,23 | 25,43 | 5,81 | 0,09 | 0,96 | 0,01 | 32,34 | 61,08 | 1,60 | 38,92 |
| 2018/15928 | Pressée | Vache  | Pasteurisé | 13,09 | 2,31  | 5,98 | 0,14 | 0,97 | 0,00 | 30,80 | 56,59 | 1,95 | 43,41 |
| 2019/00628 | Pressée | Vache  | Cru        | 43,39 | 5,27  | 5,66 | 0,09 | 0,95 | 0,00 | 26,77 | 53,07 | 2,89 | 46,94 |
| 2019/00822 | Pressée | Vache  | Cru        | 30,22 | 11,61 | 5,97 | 0,02 | 0,97 | 0,00 | 31,77 | 57,59 | 1,82 | 42,41 |