

Des communautés microbiennes au service de la qualité des fromages : Diversité et dynamique adaptative et fonctionnelle des populations endogènes etensemencées

Delbès C.¹, Monnet C.², Irlinger F.²

¹INRA UR 545 Recherches Fromagères, F-15000 Aurillac

²INRA UMR 782 GMPA, F-78850 Thiverval-Grignon

Correspondance : celine.delbes@clermont.inra.fr

Résumé

Les fromages traditionnels hébergent un microbiote diversifié, composé de populations microbiennes endogènes et de ferments, qui joue un rôle majeur dans le développement des qualités sanitaires et sensorielles du produit fini. La connaissance de la diversité microbienne taxonomique et fonctionnelle des produits laitiers s'enrichit depuis ces trois dernières années des apports des approches (méta)génomiques. Plus de 100 genres et 400 espèces microbiennes ont été détectés dans le lait cru et les fromages. Des réservoirs environnementaux potentiels de cette diversité ont été identifiés. Cependant, comparés à ceux de souches environnementales, les génomes de micro-organismes isolés de fromage peuvent contenir des signatures génétiques de leur adaptation à l'habitat fromage. Des différences de caractéristiques sensorielles et d'équilibre des composés volatils aromatiques entre des fromages au sein d'une même technologie ont été associées à des différences dans la composition et la dynamique des populations microbiennes. Toutefois, le lien avec l'expression du potentiel enzymatique microbien dans le fromage reste difficile à établir. Les récents progrès technologiques permettant l'analyse d'ARN messager microbien *in situ* dans le fromage devraient permettre de mieux comprendre comment fonctionnent dans leur globalité les principaux acteurs fromagers.

Mots-clés: Fromage, diversité microbienne, potentiel fonctionnel, métagénomique, transcriptomique

Abstract: Microbial communities for the benefit of cheese quality: Diversity, adaptive and functional dynamics of indigenous populations and starters

Traditional cheeses host a diverse microbiota, composed of indigenous microbial populations and of starters, which plays a major role in the development of sanitary and sensory qualities of ripened cheese. Knowledge of the taxonomic and functional microbial diversity in dairy products has been enriched over the past three years by the results of (meta)genomic approaches. More than 100 genera and 400 microbial species were detected in raw milk and cheeses. Potential environmental reservoirs of diversity have been identified. However, compared with those of environmental strains, genomes of microorganisms isolated from cheese may contain genetic signatures of their adaptation to the cheese habitat. Differences in sensory characteristics and balance of volatile aromatic compounds between cheeses from the same technology have been associated with differences in the composition and dynamics of microbial populations. However, the link with the expression of microbial enzymatic potential in cheese is difficult to establish. Recent technological advances allowing the *in situ* analysis of microbial messenger RNA in cheese should provide a better understanding of the main cheese actors global functioning.

Keywords: Cheese, microbial diversity, functional potential, metagenomics, transcriptomics

Introduction

Les fromages traditionnels hébergent un microbiote diversifié, composé de populations microbiennes endogènes, naturellement présentes, et de ferments. Ce microbiote joue un rôle majeur dans le développement des qualités sanitaires et sensorielles du produit fini. Les populations microbiennes interagissent entre elles et avec la matrice laitière, dans une trajectoire dynamique de la fabrication à la fin de l'affinage du fromage. L'un des leviers pour une meilleure maîtrise des qualités sanitaires et sensorielles des fromages s'appuie donc sur la gestion de la composition et de la dynamique microbiennes afin de favoriser l'expression des fonctions d'intérêt technologique par les communautés microbiennes du lait et les ferments. Ceci implique de disposer d'un socle de connaissances sur i) la composition et l'origine des communautés microbiennes fromagères, ii) les capacités et les modes d'adaptation à l'habitat fromage ainsi que les potentialités fonctionnelles des micro-organismes fromagers. Les approches « omiques » en pleine expansion nous permettent aujourd'hui d'explorer la diversité taxonomique et les potentialités fonctionnelles des communautés microbiennes fromagères dans leur globalité et avec une profondeur sans précédent. Elles offrent également l'opportunité d'évaluer l'expression des fonctions microbiennes *in situ* dans les aliments. Ces différents aspects, abordés dans différents laboratoires de l'INRA et par d'autres équipes françaises ou internationales, seront développés ci-dessous.

1. Composition et origine des communautés microbiennes fromagères

1.1 La métagénomique au service de l'écologie du microbiote du lait au fromage affiné

La connaissance de la diversité microbienne des produits laitiers fut d'abord acquise par des méthodes de culture des micro-organismes. Elle a été considérablement enrichie par des analyses taxonomiques de plus en plus fine grâce aux méthodes moléculaires, jusqu'aux approches dites « métagénomiques » les plus récentes (revue de Quigley et al., 2011). Ces dernières s'appuient sur les techniques de séquençage d'ADN de nouvelle génération à haut débit (NGS : New Generation Sequencing).

Il existe deux types d'approche métagénomique. La première, dite métagénomique monogénique, est basée sur le séquençage massif d'amplicons de gènes de marqueurs taxonomiques. La profondeur d'analyse de cette approche permet de caractériser la composition et d'estimer les proportions des populations au sein des communautés microbiennes en donnant accès à la diversité de populations sous-dominantes pouvant représenter jusqu'à 0.1% de la communauté. De plus, cette technique, permettant le séquençage simultané de plusieurs centaines d'échantillons, offre l'opportunité de mettre en œuvre des traitements statistiques robustes et ainsi d'établir des corrélations entre la structure des communautés microbiennes et les paramètres environnementaux (pratiques d'élevage, paramètres de technologie fromagère...). Cependant, les microorganismes sont actuellement identifiés au niveau du genre dans la plupart des cas. Il est donc crucial de développer des outils d'affiliation taxonomique plus performants pour atteindre le niveau de l'espèce.

La métagénomique monogénique a été récemment appliquée à la caractérisation du microbiote de laits de vache crus et pasteurisés (Kuehn et al., 2013 ; Quigley et al., 2013), de laits crus de chèvre (McInnis et al., 2015), de laits fermentés (Bokulich et al., 2015 ; Liu et al., 2015), mais également de divers fromages, tels que le fromage belge à pâte molle et croûte lavée Herve (Delcenserie et al., 2014), divers fromages irlandais à pâte molle et à pâte pressée (Quigley et al., 2012 ; O'Sullivan et al., 2015), le fromage mexicain à pâte molle Poro (Aldrete-Tapia et al., 2014), le fromage italien Fontina (Dolci et al., 2014), le fromage polonais à pâte filée et fumée Oscypek (Alegria et al., 2012), un fromage danois au lait cru (Masoud et al., 2011, 2012). Une étude a porté sur la diversité microbienne dans les fromages et l'environnement de deux fromageries américaines fabriquant des fromages à pâte molle à croûtes fleuries et lavées (Bokulich et al., 2013). Celle-ci a permis de mettre en évidence la présence de

populations dominantes adaptées à l'environnement fromager (bactéries lactiques, actinobactéries, Gamma-protéobactéries halotolérantes). Une autre étude pionnière de grande ampleur portant sur la diversité microbienne de croûtes de 137 fromages prélevés dans 9 pays européens et aux Etats Unis (Wolfe et al., 2014) offre une première opportunité de mettre en relation les profils de diversité microbienne avec le type de croûte et une sélection de paramètres technologiques (pH, Aw, température). Des travaux en cours au sein de plusieurs unités de l'INRA, sur le fromage Cantal (Frétin et al., 2015), des fromages à pâte persillée (Duval et al., 2015), et un ensemble de 13 fromages AOP à pâte molle et à pâte pressée non cuite (Dugat-Bony et al., 2015a), viendront compléter le panorama de la diversité microbienne des fromages français.

La seconde approche, dite métagénomique « shotgun », vise le séquençage de l'ensemble du génome des microorganismes dominants au sein de la communauté. Elle permet de caractériser à la fois la composition taxonomique et les potentialités fonctionnelles (gènes de fonctions) des communautés microbiennes. Pour cela il est nécessaire de disposer de bases de données rassemblant les séquences de génome du plus grand nombre possible d'espèces microbiennes présentes dans les fromages. L'exhaustivité et la précision de l'annotation des génomes dans ces bases de données sont déterminantes pour la précision et la fiabilité de l'identification des activités métaboliques associées aux gènes mis en évidence parmi les séquences métagénomiques. A ce jour, très peu d'études ont exploré les potentialités fonctionnelles de communautés microbiennes de fromages par métagénomique (Almeida et al., 2014 ; Dugat-Bony et al., 2015b ; Wolfe et al., 2014). Une approche de ce type a permis à Wolfe et al. (2014) d'identifier des fonctions potentielles de bactéries du genre *Pseudoalteromonas*, naturellement présentes dans des fromages à croûtes lavées et fleuries.

Enfin, il est à noter que, par le volume et la complexité des données générées, l'analyse des résultats d'études de métagénomique, plus particulièrement de type « shotgun », demande des interfaces informatiques adaptées et une forte technicité en bioinformatique et biostatistique.

1.2 Bilan des genres et des espèces détectées dans les fromages

Deux revues récentes ont permis de mettre à jour le catalogue des genres et des espèces détectés dans plusieurs variétés de fromages au cours de ces quinze dernières années (Montel et al., 2014 ; Irlinger et al., 2015). Des éléments de l'article de Montel et al. (2014) sont repris de la traduction en français réalisée par M.C. Montel et C. Chatelard-Chauvin (Pôle Fromager AOP Massif Central, Aurillac). La synthèse de ces données publiées montre que les populations microbiennes varient d'une variété fromagère à l'autre, mais également au sein même d'une variété, en fonction du lieu de production ou de la saison. La signature spécifique d'une communauté fromagère est due à la présence et à l'abondance de différentes espèces microbiennes, plutôt que d'une espèce en particulier. De nombreuses espèces sont communes à la plupart des variétés fromagères, mais elles s'assemblent selon des niveaux différents de complexité et de concentration, qui peuvent varier au cours du processus de maturation du fromage, mais aussi en fonction du type de technologie (pâte molle, pâte pressée cuite, pâte pressée non cuite) et du type de croûte (lavée, naturelle, fleurie). Les communautés microbiennes sont ainsi des assemblages simples ou complexes de microorganismes, dont la diversité peut aller de quelques espèces à plusieurs dizaines d'espèces, composées le plus souvent de firmicutes, d'actinobactéries, de protéobactéries, de bactérioidetes, de levures et de moisissures.

1.2.1. Diversité microbienne dans la pâte des fromages

Au cœur des fromages au lait cru à pâte pressée cuite et à pâte filée, les bactéries lactiques dominent largement à toutes les étapes de la fabrication du fromage, avec les bactéries propioniques dans les fromages à pâte pressée cuite de type emmental. Les principales espèces de bactéries lactiques thermophiles sont *Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* et / ou *Lactobacillus fermentum*. Les bactéries lactiques mésophiles autres que les ferments, principalement *Lactobacillus paracasei*, mais aussi *Lactobacillus rhamnosus*, prédominent après 10 à 30 mois

d'affinage (Rossi et al., 2012). Les levures, les bactéries Gram-positives et catalase positives, les entérocoques et les pédiocoques sont sous-dominantes (Demarigny et al., 1997 ; Rossi et al., 2012).

A cœur des fromages affinés à pâte pressée non cuite, l'équilibre des espèces dominantes varie avec le temps et selon la variété de fromage. Cependant, les bactéries lactiques sont le groupe microbien dominant (>9 log ufc / g). Au moins 21 espèces différentes de bactéries lactiques, incluant sept genres, sont rencontrées. Les plus répandues et les plus souvent dominantes sont *Lc. lactis*, *S. thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. Parmi le groupe des firmicutes, les staphylocoques sont importants dans ces fromages (jusqu'à 5 log ufc / g) avec au moins quatre espèces pouvant être présentes (Delbès et al., 2007 ; Quigley et al., 2012), suivis par la famille des Clostridiales (Quigley et al., 2012). Les protéobactéries (jusqu'à 8 log ufc / g) (Delbès-Paus et al., 2012) se déclinent en au moins neuf genres, principalement des genres d'entérobactéries tels que *Enterobacter* et *Klebsiella*, mais aussi d'autres Gamma-protéobactéries comme *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* et *Psychrobacter* (Delbès et al., 2007 ; Quigley et al., 2012). Des populations sous-dominantes d'actinobactéries (jusqu'à 4 log ufc / g) appartenant à au moins sept genres, dont les plus fréquents sont *Corynebacterium* (*Corynebacterium flavescens*, *Corynebacterium variabile*), *Arthrobacter* (*Arthrobacter arilaitensis*) et *Brevibacterium* (*Brevibacterium linens*) (Delbès et al., 2007 ; Duthoit et al., 2003 ; Quigley et al., 2012) sont également détectées. Enfin, des populations mineures appartenant au phylum des Bacteroidetes tels que *Chryseobacterium* et *Prevotella* ont été rapportés occasionnellement (Delbès et al., 2007 ; Quigley et al., 2012). Fait intéressant, la plupart des fromages non cuits abritent une grande diversité d'espèces de levure appartenant à 13 genres différents, principalement *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*.

Enfin, l'hétérogénéité génomique intra-espèce parmi les bactéries lactiques indigènes est grande au sein d'un fromage et entre les fromages de différentes origines (Callon et al., 2004 ; Feutry et al., 2012). Plusieurs souches de la même espèce peuvent coexister dans les fromages, dans des proportions différentes de celles trouvées dans les laits crus, ce qui suggère qu'une sélection s'opère au cours de la fabrication du fromage.

1.2.2. Diversité microbienne à la surface des fromages

A partir de la synthèse de plusieurs dizaines d'études de biodiversité de croûtes de fromages, 104 genres bactériens (1 Acidobacteria, 28 Actinobacteria, 5 Bacteroidetes, 24 Firmicutes et 46 Proteobacteria) et 39 genres fongiques (21 moisissures et 18 levures) ont été ainsi recensés avec une détection moyenne par fromage de 10 genres bactériens (entre 3 et 30 en fonction de la variété de fromage) et de 4.5 genres fongiques (entre 1 et 11). Parmi les levures, *Debaryomyces*, *Yarrowia*, *Candida* et *Geotrichum* sont les genres les plus fréquemment détectés, suivis de *Kluyveromyces* et *Pichia*. *Penicillium* fait partie des champignons filamenteux les plus fréquemment détectés, suivi par *Scopulariopsis* et *Fusarium*. Parmi les firmicutes, *Staphylococcus* est le genre le plus présent en surface, les autres genres appartenant au groupe des bactéries lactiques acidophiles (*Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Vagococcus*, et halophiles (*Marinilactibacillus* et *Facklamia*). Les actinobactéries, telles que *Brevibacterium*, *Corynebacterium* et *Arthrobacter* sont également bien représentées, suivies par *Brachybacterium*, *Microbacterium*, *Agrococcus* et *Micrococcus*. Les genres *Psychrobacter*, *Halomonas*, *Pseudoalteromonas* et *Vibrio*, appartenant au groupe des protéobactéries, font également partie intégrante de la communauté microbienne de surface des fromages, puisqu'ils sont détectés dans environ un tiers des fromages. Alors que ces bactéries à gram négatives sont considérées, en général, comme des indicateurs de problèmes d'hygiène et d'altération, des études sur quelques espèces (*Proteus vulgaris*, *Hafnia alvei*, *Psychrobacter celer*), ont montré que leur présence avait un réel impact écologique et sensoriel sur le produit final, contribuant significativement aux qualités organoleptiques du fromage (Irlinger et al., 2012 ; Coton et al., 2012 ; Deetae et al., 2009 ; Deetae et al., 2011 ; Delbès-Paus et al., 2012 ; Delbès-Paus et al., 2013).

1.3 Part dans la communauté microbienne des espèces intentionnellement ajoutées comme ferments d'acidification ou d'affinage.

Parmi les genres mentionnés ci-dessus, certains sont connus pour être des ferments lactiques ou d'affinage et être délibérément inoculés au cours du procédé de fabrication fromagère. Ainsi, les espèces fongiques filamenteuses, très adaptées à la surface du fromage telles que *Penicillium camemberti*, *P. roqueforti*, *Fusarium domesticum* ainsi que la levure filamenteuse *Geotrichum candidum* mais aussi *Scopulariopsis flava* sont communément utilisées et trouvées dans les fromages nécessitant un aspect duveteux ou persillé, tels que le Camembert, le Brie, le Taleggio, le Reblochon, le Saint-Nectaire, le Tilsit, le Limburger, la Raclette, le Roquefort, le Gorgonzola, le Stilton, le Bleu danois, le Cabrales ou bien l'Havarti danois et le Tilsit. Les levures commerciales les plus communes sont *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus* et *Debaryomyces hansenii*, très tolérantes au sel et au pH acide. Les espèces de bactéries lactiques, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *L. lactis* ssp. *cremoris* sont les principaux ferments lactiques mésophiles utilisés dans la fabrication du fromage. Elles sont souvent associées avec d'autres bactéries lactiques mésophiles (*Leuconostoc mesenteroides*, *L. pseudomesenteroides*) ou thermophiles (*Streptococcus thermophilus*). Les bactéries non levains, qui correspondent principalement aux lactobacilles hétérofermentaires (*Lactobacillus paracasei*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. curvatus* et *Pediococcus acidilactici*) peuvent dans certaines technologies, être ajoutées en tant que cultures auxiliaires pour accélérer le processus de maturation. Enfin, d'autres ferments d'affinage, incluant *Propionibacterium freudenreichii*, une actinobactérie microaérophile impliquée dans la saveur et la formation de trous dans les pâtes pressées cuites, des staphylocoques à coagulase négative (principalement *S. xylosus* et *S. equorum*) et d'autres actinobactéries aérobies (*Brevibacterium aurantiacum*, *B. linens*, *Arthrobacter arilaitensis*, *Corynebacterium casei*, *C. variable*, *Brachybacterium alimentarium* et *Microbacterium gubbeenense*) sont également ensemencées de façon dirigée et contribuent à l'aromatisation et à la coloration des fromages affinés en surface (Irlinger and Mounier, 2009). La seule bactérie à Gram-négatif utilisée comme ferment d'affinage est l'entérobactérie *Hafnia alvei*. Elle est inoculée dans les fromages à pâte molle fabriqués avec du lait pasteurisé car elle accentue l'arôme fromager en favorisant la production de composés soufrés volatils (Irlinger et al., 2012).

Depuis une dizaine d'années, des études sur la diversité microbienne de fromages ont montré que les ferments d'affinage commerciaux utilisés pour la fabrication de fromages ne font pas forcément partie de la communauté dominante (Cogan et al., 2014 ; Feurer et al., 2004 ; Goerges et al., 2008 ; Larpin-Laborde et al., 2011). Par exemple, l'espèce *Brevibacterium aurantiacum* (anciennement assignée à *B. linens*), fréquemment utilisée pour l'aromatisation et la pigmentation de fromages à croûte lavée, est trouvée sporadiquement à la surface de ces fromages. Dans une étude portant sur la diversité des communautés microbiennes issues de 137 croûtes de fromage, il a été estimé que 60% des genres bactériens et 25% des genres fongiques détectés ne proviennent pas de ferments commerciaux (Wolfe et al., 2014). Les espèces issues de l'environnement de la fromagerie appartiennent en général aux protéobactéries halotolérantes d'origine marine (*Psychrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Halomonas*, *Vibrio* et *Advenella*), aux bactéries lactiques halophiles et alcalophiles (*Vagococcus*, *Facklamia* et *Marinilactibacillus*). Parmi les levures, *Yarrowia lipolytica* est omniprésente à la surface de certains fromages, pouvant même atteindre en fin d'affinage des concentrations plus fortes que celles des levures commerciales comme *D. hansenii* ou *G. candidum*. De plus, quelques études ont montré que les souches microbiennes dominantes à la surface des fromages étaient assignées à des espèces connues pour être inoculées (*S. xylosus*, *S. equorum*, *C. variable*, *B. aurantiacum*, *A. arilaitensis*, *C. casei*...), mais ne correspondaient pas aux profils spécifiques des ferments d'affinage ajoutés et provenaient donc de l'environnement (Goerges et al., 2008 ; Gori et al., 2013).

Les micro-organismes, sélectionnés comme cultures auxiliaires ou ferments d'affinage, pour leur capacité à exprimer des fonctions technologiques définies, se comportent souvent différemment au sein de communautés microbiennes complexes, sans doute en raison de leur mauvaise adaptation aux

processus de fabrication de fromage et de leur manque de compétitivité vis-à-vis du microbiote endogène.

1.4 Origine de la diversité microbienne : de la production du lait à la fin de l'affinage

La composition microbienne des fromages, et en particulier celle des croûtes est fortement influencée par la communauté environnementale présente tout au long de la chaîne de production du fromage (du lait à la cave d'affinage).

1.4.1 Les microbiotes des laits de ferme

Dans les pays industrialisés depuis les années 1980, les pratiques de nettoyage et de désinfection des trayons ont amélioré la qualité hygiénique du lait cru et de façon concomitante diminué sa charge microbienne (Beuvier et Buchin, 2004), qui varie actuellement de 5000 à 10 000 unités formant colonies par ml (ufc / ml).

Il est difficile d'évaluer les changements dans la diversité microbienne du lait au cours des dernières décennies en raison des énormes progrès dans les méthodes d'investigation. Les techniques moléculaires ont permis de détecter de nombreuses autres espèces à côté des bactéries lactiques. Ainsi, malgré les faibles niveaux de populations, le lait présente encore une substantielle diversité microbienne. Un échantillon de lait peut contenir jusqu'à 36 espèces microbiennes dominantes (Callon et al., 2007 ; Fricker et al., 2011 ; Saubusse et al., 2007). Au total, plus de 100 genres et 400 espèces microbiennes ont été détectés dans le lait cru. Celles-ci sont principalement des bactéries Gram négatif (> 90 espèces), des bactéries Gram positif et catalase positive (> 90 espèces), des bactéries lactiques (> 60 espèces), des levures (> 70 espèces) et des moisissures (> 40 espèces). Pour tous les groupes microbiens, la variabilité inter-ferme est grande, en lien avec la variété des pratiques au niveau de la production de lait, alors que la variabilité intra-ferme est généralement beaucoup plus faible, malgré des variations d'une saison à l'autre (Desmasures et Guéguen, 1997; Michel et al., 2001).

Le lait cru est souvent conservé à une température de réfrigération avant la fabrication du fromage, surtout quand il n'est pas transformé directement à la ferme. Ce stockage réfrigéré modifie l'équilibre microbien du lait, généralement en faveur des bactéries Gram négatif (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*) (Fricker et al., 2011 ; Raats et al., 2011 ; Rasolofo et al., 2010).

1.4.2 Transfert microbien des réservoirs environnementaux au lait cru

La composition du microbiote du lait dépend directement de la composition du microbiote des réservoirs directement en contact avec le lait : les trayons et le matériel de traite tels que la machine à traire, le lactoduc et le tank. Les soins et le lavage des trayons, ainsi que la désinfection de l'équipement de traite sont donc de première importance (Mallet et al., 2012 ; Verdier-Metz et al., 2009). Elle dépend aussi de la composition du microbiote de sources indirectes (l'alimentation, la litière, l'eau potable et l'eau de lavage, l'air de la stabulation ou de la salle de traite, le trayeur...).

Le canal (Gill et al., 2006) ainsi que la surface des trayons sont des sources directes potentielles de micro-organismes pour le lait de ferme, mais toutes les espèces bactériennes à la surface des trayons ne sont pas présentes dans le lait cru (Verdier-Metz et al., 2012a). Le microbiote de surface des trayons est dominé par les staphylocoques à coagulase négative et les bactéries corynéformes, des entérobactéries, des bactéries d'altération (par exemple les spores butyriques), des bactéries lactiques (par exemple *Lc. lactis*) et des bactéries Gram négatif non-fermentaires telles que *Pseudomonas*. Les matières fécales peuvent être des sources indirectes d'Entérobactéries, de bactéries d'altération diverses. Le lavage des trayons avant la traite limite la contamination de la pointe du trayon. Enfin, les biofilms sur l'acier inoxydable, le caoutchouc, le silicone, le verre et / ou le plastique de l'équipement de traite peuvent être une source directe de micro-organismes pour le lait de ferme (Marchand et al., 2012).

L'alimentation des animaux (prairies, ensilage et foin) peut être une source indirecte de micro-organismes pour le lait de ferme (Verdier-Metz et al., 2012b). Les prairies hébergent des niveaux élevés de bactéries Gram négatif comme les entérobactéries, de staphylocoques, de bactéries corynéformes et de levures tandis que l'ensilage peut abriter différentes bactéries lactiques, des Protéobactéries et des moisissures. Récemment, des populations fongiques telles que *Eurotium* sp., des Actinomycetaceae mésophiles et thermophiles, des bactéries Gram positif (*Curtobacterium* sp, *Bacillus* et *Paenibacillus* sp) et des bactéries Gram négatif (*Pantoea* et *Pseudomonas* sp) ont été trouvées dans le foin (Vacheyrou et al., 2011).

La salle de traite et la stabulation peuvent également être des sources indirectes de micro-organismes par l'eau de rinçage (Leriche et Fayolle, 2012), les aérosols ou la formation de biofilm. Des équilibres microbiens différents ont été rapportés dans les bioaérosols de laiteries de petites exploitations (< 65 vaches laitières) (Vacheyrou et al., 2011) par rapport à ceux de laiteries transformant le lait de plusieurs troupeaux (> 800 vaches laitières), où les protéobactéries dominaient (Dungan, 2012 ; Ravva et al., 2011). Ces micro-organismes des aérosols proviendraient principalement des femelles laitières elles-mêmes et des particules végétales (Vacheyrou et al., 2011).

Les transferts microbiens des réservoirs au lait de ferme restent à démontrer au niveau de la souche. Des comparaisons génomiques sur génome entier pourraient fournir de nouveaux éclairages sur les flux de gènes et sur l'adaptation métabolique des souches de divers réservoirs au lait cru (Price et al., 2012).

1.4.3 Enrichissement du microbiote des laits de cuve et / ou des fromages par des équipements et des pratiques traditionnels

Certains équipements et pratiques fromagères utilisés dans la fabrication de nombreux fromages traditionnels (cuves et planches d'affinage en bois, cultures de lactosérum, solutions de morge, frottage des jeunes fromages avec des vieux) enrichissent les laits crus de cuve ou les fromages lors de la fabrication avec certaines populations microbiennes, qui sont actives pendant le process.

Les surfaces en bois des cuves de fabrication utilisées pour produire les fromages AOP Salers et AOP Ragusano sont un réservoir de micro-organismes, en particulier de bactéries lactiques. La composition en groupes ou espèces microbiennes d'un biofilm serait stable pendant plusieurs saisons une fois que celui-ci est établi à la surface de la cuve, mais varie considérablement entre les cuves (Didienne et al., 2012 ; Licitra et al., 2007). Les niveaux de populations microbiennes des laits, ainsi que la richesse en espèces et en souches de bactéries lactiques augmentent lors de leur passage dans des cuves en bois (Didienne et al., 2012 ; Lortal et al., 2009 ; Settanni et al., 2012). Ainsi, la richesse en espèces et en souches des bactéries lactiques dominantes dans un lait cru a augmenté de 50 % après quelques minutes dans une cuve en bois (Settanni et al., 2012).

Les planches d'affinage en bois sont un réservoir de micro-organismes de surface qui peuvent être transférés directement à la surface du fromage. Les levures, les moisissures et les bactéries corynéformes dominent successivement sur la surface du fromage AOP Reblochon de Savoie au lait cru. Ils dominent aussi dans les biofilms des planches d'affinage en bois (Mariani et al., 2007 ; Oulahal et al., 2009).

Le microbiote de ces biofilms, des saumures et des cultures de lactosérum est souvent complexe et varie entre les laiteries. En conséquence, ils n'ont pas été décrits en détail, en particulier au niveau de la souche et pour les populations sous-dominantes. Un suivi au niveau de la souche est nécessaire pour montrer non seulement le transfert microbien de ces biofilms, saumures et cultures aux fromages, mais aussi pour le transfert des sources environnementales aux biofilms, saumures et cultures.

2. Adaptation à l'habitat fromage et potentialités fonctionnelles des micro-organismes fromagers

2.1 Les processus évolutifs dans le fromage

Les génomes de micro-organismes isolés de fromage peuvent contenir des signatures de «domestication» dues à des événements génétiques qui contribuent à une meilleure adaptation à l'habitat fromager. Plusieurs types d'événements peuvent être distingués. Chez les bactéries, les gènes qui n'ont pas de fonctions bénéfiques pour la cellule ont tendance à être éliminés en raison de l'énergie nécessaire pour leur entretien. Ils peuvent être éliminés par recombinaison, qui est favorisée par la présence d'éléments mobiles dans le génome, telles que des séquences d'insertion. Ainsi de nombreux pseudogènes et séquences d'insertion ont été recensés dans le génome de la souche d'*Arthrobacter arilaitensis* Re117, isolée de Reblochon, montrant qu'un processus d'évolution est toujours en cours chez cette espèce (Monnet et al., 2010). Les comparaisons génomiques avec des souches d'*Arthrobacter* provenant du sol ont montré que de nombreux gènes impliqués dans le transport et le catabolisme des substrats ont été perdus chez la souche fromagère, sans doute en raison de la faible diversité de substrats présents dans les fromages.

Chez les bactéries, les transferts horizontaux de gènes peuvent se produire grâce à trois mécanismes principaux: la transformation, la transduction et la conjugaison. Ces transferts peuvent conférer un avantage sélectif à la cellule receveuse, comme il a été observé chez *A. arilaitensis* Re117. En effet, son génome contient un cluster de gènes impliqués dans le catabolisme du D-galactonate, dont l'origine provient probablement d'une souche de *Pseudomonas*. Chez *Propionibacterium freudenreichii*, la capacité à dégrader le lactose est conférée dans certaines souches par la présence d'un îlot génomique codant le transport du lactose et les premières étapes de dégradation. Cet îlot entouré de gènes de transposases et d'intégrase est vraisemblablement arrivé par transduction et conjugaison (Loux et al., 2015). L'importance des transferts horizontaux dans le royaume eucaryote est souvent considérée comme anecdotique. Toutefois, le récent séquençage des génomes d'une souche de *Penicillium roqueforti* et de *P. camemberti* a montré la présence d'une grande région (~ 500 ko) connue sous le nom de Wallaby, qui a résulté de transferts horizontaux (Cheeseman et al., 2014). Wallaby a été trouvé presque exclusivement chez les espèces isolées d'environnement alimentaire mais son rôle dans le fonctionnement de la cellule n'a pas encore été établi.

La vitesse à laquelle les micro-organismes évoluent pour s'adapter à l'habitat fromager n'est pas connue. Toutefois, la propagation d'une souche de *Lactococcus lactis* isolée à partir de matériel végétal fermenté, après seulement 1000 générations dans le lait, a donné lieu à plusieurs modifications génétiques composées de mutations ponctuelles et de délétions de gènes (Bachmann et al., 2012). Le fromage est produit et consommé par l'homme depuis des milliers d'années. On peut donc supposer que certains micro-organismes fromagers sont les fruits de profondes adaptations génétiques, qui ont pu même conduire à de nouvelles espèces.

2.2 Facteurs impliqués dans la croissance des micro-organismes à la surface et au cœur du fromage : exemple de la pâte molle

Plusieurs facteurs sont importants pour la croissance des microorganismes se développant dans et à la surface des fromages (Monnet et al., 2015).

- L'évolution du pH au cours du procédé de fabrication du fromage est ainsi responsable de la croissance séquentielle des différents groupes microbiens qui colonisent le fromage au cours du temps. En début d'affinage, la valeur assez basse du pH (aux alentours de 5), due à l'acidification du gel caillé par les bactéries lactiques, favorise la croissance des levures et des moisissures aérobies, beaucoup plus tolérantes à l'acidité que les bactéries. Cette capacité à tolérer des milieux acides chez certains eucaryotes semble être reliée à l'activité de l'ATPase membranaire qui régule le pH intracellulaire en exportant de façon très efficace les protons hors de la cellule. La croissance précoce des levures et des

moisissures permet ensuite l'augmentation du pH, en particulier à la surface du fromage (pH 5,5 à 6.0) en transformant le lactate en CO₂ et en produisant de l'ammoniac à partir du catabolisme des acides aminés. A ce stade, les bactéries acido-sensibles aérobies (actinobactéries) ainsi que les bactéries lactiques "non levain" (NSLAB) commencent à croître.

- En début de production, la température de caillage est élevée (entre 20°C et 30°C) afin de permettre une croissance optimale des bactéries lactiques et ainsi favoriser une acidification rapide. L'étape d'affinage par contre est réalisée à des températures plus basses. Les micro-organismes se développant durant cette dernière étape, comprennent donc des mésophiles mais aussi des psychrophiles et des psychrotrophes, avec des activités spécifiques (protéolytiques et lipolytiques) à basses températures.

- L'humidité relative des caves d'affinage a également une influence sur la croissance de micro-organismes à la surface du fromage. Par exemple, *P. camemberti* pousse moins bien à une humidité relative de plus de 95% (Leclercq-Perlat et al., 2013). Il est ainsi connu que pour les fromages à croûtes emmorgées, une forte humidité dans les chambres de maturation, combinée avec un brossage répété des fromages avec de l'eau salée, empêchent la croissance des moisissures. Des corrélations ont été également trouvées entre les valeurs d'humidité relative mesurées sur les différents types de croûte de fromage et la composition microbiennes de 137 fromages (Wolfe et al., 2014). Dans cette étude, l'abondance du champignon *Geotrichum* et de quatre genres de protéobactéries (*Psychrobacter*, *Vibrio*, *Pseudomonas* et *Pseudoalteromonas*) a été positivement corrélée à des croûtes humides alors que *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, *Actinobacteria* et *Staphylococcus* ont été détectées de façon significative sur des croûtes naturelles, plus sèches. A cœur des fromages affinés à pâte pressée non cuite, l'équilibre des espèces dominantes varie avec le temps et entre les variétés de fromage. En effet, la composition physico-chimique et la texture des fromages sont très variables, comme le montre la teneur en eau (42% - 55%).

- Les fromages sont salés par application directe en surface ou par immersion dans un bain de saumure saturé en sel. Alors que la levure *Debaryomyces hansenii* est connue pour être fréquemment isolée d'environnements salés et croître jusqu'à des teneurs en sel de 16%, *Geotrichum candidum* est l'espèce de levure considérée comme la moins tolérante au sel. La croissance des actinobactéries, *Brevibacterium linens* et *Corynebacterium sp.*, est stimulée par l'ajout de 4% de sel. Ces bactéries tolèrent des teneurs en sel allant jusqu'à 16%. L'analyse génomique de souches de *Brevibacterium aurantiacum*, de *Corynebacterium casei*, de *C. variable* et d'*Arthrobacter arilaitensis*, isolées de fromages, a montré qu'elles possèdent des systèmes de protection très efficaces contre le stress osmotique, en permettant par exemple l'accumulation dans leur cytoplasme d'osmoprotectants tels que l'ectoïne, la proline et la glycine bêtaïne. Quinze gènes impliqués dans le transport de la glycine bêtaïne et d'autres osmolytes ont été ainsi détectés chez *A. arilaitensis* Re117, une souche d'origine fromagère alors qu'un nombre bien plus faible (6 à 9) a été recensé chez les souches d'*Arthrobacter* isolées du sol, beaucoup moins tolérantes à des concentrations élevées en sel (Monnet et al., 2010). De la même façon, une particularité du génome de *B. aurantiacum* ATCC9174 est le grand nombre de transporteurs de différents osmoprotectants (bêtaïne, carnitine et choline), au nombre de 9, en comparaison du nombre moyen (1.5) que possèdent les actinomycétales d'autres origines.

- Le fromage est un habitat très restreint en fer parce que le lait est pauvre en fer (de 0,2 à 0,4 mg l⁻¹) et qu'il contient de la lactoferrine, une protéine qui a un effet antibactérien du à sa capacité à chélater le fer. Dans des fromages expérimentaux, où nous avonsensemencé une bactérie lactique (*L. lactis*), une levure (*D. hansenii*) et différentes bactéries d'affinage (*Arthrobacter*, *Corynebacterium* ou *Brevibacterium*), l'addition de fer ou de sidérophores a stimulé de façon significative la croissance des bactéries d'affinage alors qu'elle n'a eu aucun impact sur la croissance de la bactérie lactique et la levure (Monnet et al., 2012). Les génomes des 4 bactéries fromagères, *C. variable* DSM 44702, *C. casei* UCMA 3821, *A. arilaitensis* Re117 et *B. aurantiacum* ATCC 9174, sont bien équipés en gènes impliqués dans l'acquisition du fer, comme la production de sidérophores, de transporteurs type ABC

fer-sidérophore (Monnet et al., 2010, 2012 ; Schröder et al., 2011 ; Layec et al., article en préparation). Nous avons également détecté un opéron *sbn* codant pour des protéines impliquées dans la biosynthèse d'un sidérophore type staphylobactin chez la souche fromagère *Staphylococcus equorum* Mu2, montrant là encore que cette espèce spécifique du fromage est capable de capter le fer au cours de sa croissance à la surface du fromage (Irlinger et al., 2012). Les champignons appartenant aux *Pezizomycotina* tels que *Penicillium* sp. sont capables de produire des sidérophores (Winkelmann 2007), alors que les *Saccharomycotina* tels que *K. lactis*, *D. hansenii*, *G. candidum* et *Y. lipolytica* ne peuvent pas les synthétiser. Cependant, ils sont capables d'importer dans leurs cellules les sidérophores produits par d'autres micro-organismes (Blaiseau et al., 2010). Il est donc possible que l'acquisition du fer soit à l'origine de certaines interactions (compétition et commensalisme) entre les micro-organismes qui se développent sur la surface de fromage.

2.3 Les fonctions d'intérêt technologique portées par les micro-organismes fromagers

La diversité des caractéristiques sensorielles des fromages résulte de la diversité des proportions des composés aromatiques provenant de nombreuses voies métaboliques (dégradation des sucres, du citrate, du lactate, des acides aminés et des acides gras, décomposition de la caséine et lipolyse). Le métabolisme est oxydatif en surface, tandis que des voies fermentatives se produisent dans la pâte. Plusieurs espèces peuvent coopérer dans une voie métabolique, par leurs activités enzymatiques potentielles multiples et variées (Irlinger et Mounier, 2009 ; Mounier et al., 2006, 2008).

Les bactéries lactiques présentes dans la pâte du fromage possèdent de nombreux systèmes enzymatiques, qui leur permettent d'assurer des fonctions (fermentation du lactose, du lactate, du citrate, des sucres aminés, du glycérol mais aussi le catabolisme des peptides, acides aminés et des lipides) très variables selon les espèces et les souches. Elles sont déterminantes pour la qualité sensorielle du fromage.

Pour certains fromages à pâte pressée cuite, la flaveur est aussi significativement impactée par les bactéries propioniques provenant du lait cru (Comté) ou ajoutées comme ferment d'affinage (Emmental). Elles produisent de l'acide acétique, de l'acide propionique et du CO₂ à partir du lactate, des composés d'arôme issus du catabolisme des acides aminés à chaîne ramifiée, ont une activité lipolytique sur la matière grasse laitière et synthétisent des esters (Thierry et al 2011; Abeijon et al., 2014). Dans les fromages à pâte persillée, *P. roquefortii* intervient dans l'équilibre des composés cétones / alcools / aldéhydes.

Malgré l'abondance et la diversité des bactéries Gram négatif dans le lait cru et les fromages traditionnels, les potentialités fonctionnelles de seulement quelques espèces ont été étudiées. Les fromagers évoquent leur rôle aromatisant principalement dans les fromages pour lesquels le microbiote de surface joue un rôle crucial dans la flaveur. Les entérobactéries ont un fort potentiel aromatique car elles peuvent cataboliser le citrate, les lipides et les protéines (Chaves-Lopez et al., 2006). Inoculés en surface d'un fromage modèle à croûte lavée, *Proteus vulgaris* (Deetae et al., 2009) ou *Psychrobacter celer* (Irlinger et al., 2012) entraînaient une augmentation des niveaux et de la variété de composés aromatiques tels que des cétones et des composés ramifiés (aldéhydes, alcools et esters). *Hafnia alvei* augmentait les composés soufrés volatils dans un fromage à croûte lavée (Irlinger et al., 2012), mais pas dans un fromage à pâte pressée non cuite (Delbès-Paus et al., 2012). Les bactéries Gram négatif peuvent produire des amines biogènes et peuvent engendrer des altérations. Néanmoins, *H. alvei* est couramment utilisé comme ferment (Bourdichon et al., 2012).

Quelques études réalisées avec des fromages expérimentaux produits avec différents laits crus dans les mêmes conditions de fabrication et d'affinage soulignent le rôle de l'abondance et de la diversité du microbiote des laits crus dans le développement des caractéristiques sensorielles des fromages. Dans des fromages à pâte pressée, la composition du microbiote indigène de lait cru affectait les caractéristiques de texture et de goût des fromages ainsi que la dynamique et l'équilibre des composés

volatils et aromatiques (acides, aldéhydes, alcools, cétones, esters, et composés soufrés) (Buchin et al., 2004). Ces différences ont été associées à des différences dans la dynamique des populations microbiennes. La diversité microbienne génère donc de la diversité sensorielle, mais la corrélation entre les niveaux microbiens et les attributs sensoriels est difficile à établir. Néanmoins, dans des fromages Salers, chaque attribut sensoriel a été associé à plusieurs groupes microbiens identifiés à partir des profils microbiens des fromages affinés, obtenus en analysant l'ADNr 16S (Duthoit et al., 2005). L'alimentation des vaches laitières influence notamment la composition de la matière grasse du lait (Chilliard et al., 2007), ce qui a un effet sur la qualité sensorielle des fromages (Coppa et al., 2011). Le rôle des microorganismes dans cette interaction reste encore mal compris. Une première étude par une approche métagénomique monogénique dans des fromages Cantal a montré que la diversité bactérienne et les équilibres entre les groupes microbiens étaient différents entre les laits et les fromages issus de deux régimes contrastés et affectant le profil en acides gras des laits (Frétin et al., 2015).

Toutefois, les facteurs régulant l'expression du potentiel enzymatique microbien dans le fromage et le lien entre cette expression et la dynamique microbienne et l'environnement du fromage (facteurs extrinsèques et intrinsèques du fromage) sont difficiles à établir. En particulier, les nombreuses interactions microbiennes impliquées dans la dynamique du microbiote sont loin d'être élucidées. Elles déterminent et dans le même temps sont régies par des facteurs intrinsèques au fromage (disponibilité des substrats et des co-facteurs, présence de composés inhibiteurs / activateurs, pH et potentiel redox) et des facteurs extrinsèques (disponibilité de l'oxygène, température, humidité relative). Les processus de fabrication et d'affinage du fromage déterminent l'ensemble des dynamiques dans l'écosystème fromager.

3. Evaluation de l'activité microbienne *in situ* dans les aliments : Élaboration d'indicateurs biologiques via la quantification d'ARN messagers

3.1 La métatranscriptomique pour tracer des activités microbiennes spécifiques

La physiologie et l'activité des micro-organismes au sein de produits alimentaires fermentés sont peu connues en raison de la complexité de la matrice alimentaire et de la présence d'un microbiote dont la composition est mal caractérisée. À ce jour, un nombre important de travaux portant sur les fonctions d'intérêt technologique de micro-organismes colonisant le fromage a été publié mais de façon incomplète. Ces études concernent principalement la capacité de ces micro-organismes à générer des fonctions telles que la protéolyse, la lipolyse et / ou des activités cataboliques spécifiques permettant la production de composés aromatiques ou d'inhibiteurs. Avec les récents progrès des technologies de séquençage à haut débit (HTS) et le développement de méthodes permettant l'extraction directe et la quantification d'ARN messenger microbien *in situ* dans le fromage (Monnet et al., 2008), il est maintenant possible de mieux comprendre comment fonctionnent dans leur globalité les principaux acteurs fromagers. Ainsi, des analyses métatranscriptomiques basées sur la technique RNA-seq ont permis de suivre au cours du temps, dans un Camembert, l'activité métabolique d'une communauté simplifiée, composée essentiellement d'une levure, *Geotrichum candidum*, et d'un champignon, *Penicillium camemberti*, et de mettre en évidence les fonctions et les voies métaboliques clés qui sont exprimées au cours du processus de maturation (Lessard et al., 2014). Le génome de ces deux organismes n'étant pas disponible au moment de la publication de cette étude, l'assemblage *de novo* des données RNA-seq, avec des longueurs de séquences suffisantes, a été nécessaire avant l'annotation fonctionnelle des contigs qui en ont résulté. Une autre approche basée sur les techniques RNA seq et DNA seq a été appliquée à une communauté microbienne fromagère plus complexe comprenant deux espèces fongiques et 7 espèces bactériennes (Dugat-Bony et al., 2015). Dans ce cas, les génomes de référence de l'ensemble des espèces présentes dans la communauté étaient disponibles, ce qui a

permis d'établir une base de données de référence grâce à laquelle ont pu être quantifiées les courtes séquences générées par technologie de séquençage Solid, issues d'échantillons fromagers. Ainsi, une vue globale de la dynamique de la structure de la communauté microbienne eucaryote et procaryote ainsi que les profils d'expression de son potentiel métabolique à travers un cycle d'affinage ont été obtenus. La contribution majeure des espèces microbiennes les plus dominantes (*L. lactis*, *K. lactis*, *G. candidum*, *D. hansenii* et *C. casei*) et les interactions possibles concernant les fonctions clés impliquées dans la dégradation de la matrice laitière ont été mises en évidence : les activités conjointes de la bactérie lactique *L. lactis* et de la levure *K. lactis*, au cours de la première phase de maturation, permettent la consommation rapide du lactose. Le lactate, produit à partir du lactose par *L. lactis*, est ensuite rapidement consommé par les levures *D. hansenii* et *G. candidum* pour lesquelles ont été détectés des niveaux élevés de transcrits de lactate déshydrogénase. En ce qui concerne le catabolisme des protéines et le métabolisme des lipides, la grande majorité des transcrits assignés à des gènes de *G. candidum* suggère une forte influence de cette espèce sur la dégradation des caséines et de la matière grasse. En fin d'affinage, l'analyse de l'ensemble des données RNA-seq montre que les gènes liés au catabolisme des acides aminés et appartenant à la levure *G. candidum* et aux bactéries d'affinage acido-sensibles telles que *C. casei* et *H. alvei* sont les plus exprimés. Enfin, l'analyse différentielle du métatranscriptome de l'écosystème a permis de proposer un ensemble de gènes biomarqueurs représentatifs des espèces les plus actives à différents stades de l'affinage, qui pourront être ensuite testés dans de vrais fromages.

3.2 Quantification d'ARN messagers à l'échelle de la cellule par PCR quantitative : Exemple de Bio-indicateurs d'affinage du Reblochon

La quantification d'ARN messagers par PCR quantitative est un outil important pour améliorer nos connaissances concernant les différents aspects de la physiologie microbienne au cours de l'affinage du fromage. Elle peut également être utilisée pour produire des bio-indicateurs pertinents pour la fabrication du fromage, par exemple en quantifiant l'activité de gènes impliqués dans la production de composés aromatiques. Une étude sur la physiologie et l'activité de *G. candidum* au cours de l'affinage du Reblochon (fromage français à croûte lavée, dans lequel *G. candidum* est l'une des levures dominantes) l'a récemment prouvé. L'expression de 80 gènes impliqués dans diverses fonctions a été quantifiée de façon répétable en utilisant un ensemble de trois gènes de référence stables. Tout au long de l'affinage, on a observé une diminution de l'expression des gènes impliqués dans l'organisation de la paroi cellulaire, la traduction, les constituants du cytosquelette et les gènes des protéines ribosomiques. Il y avait aussi une diminution de l'expression des gènes de l'ATP synthase F1F0 mitochondriale, impliqué dans la synthèse d'ATP et de l'H⁺ ATPase membranaire, impliqué dans la régulation du pH interne. La diminution d'expression de ces marqueurs biologique montre que *G. candidum* se développe de moins en moins au cours de l'affinage et qu'elle passe progressivement à un métabolisme de maintenance. Certains gènes impliqués dans le catabolisme du lactate, de l'acétate et l'éthanol étaient exprimés de façon plus importante en début d'affinage, montrant que la cellule consommait alors ces substrats. Au cours de la deuxième partie de l'affinage, l'expression de gènes impliqués dans le transport et le catabolisme des acides aminés augmentait fortement, ce qui est probablement dû à une modification de la source d'énergie utilisée. Une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'autophagie et de gènes impliqués dans la durée de vie des cellules a également été observée, montrant qu'à ce stade, la cellule fait un effort pour recycler davantage ses composés intracellulaires et diminuer son activité catabolique.

3.3 Quantification d'ARN messagers à l'échelle du fromage par PCR quantitative : Exemple de mesure de l'activité globale de différentes espèces dans différents fromages du commerce

Des stratégies de quantification de l'expression de gènes par des espèces microbiennes dans des fromages dont la composition microbienne n'est pas connue ont été proposées et validées avec succès sur des fromages commerciaux (Monnet et al., 2013). Les transcrits codant pour l'ARN ribosomique

16S et la malate:quinoneoxido-reductase de *Corynebacterium casei*, de *Brevibacterium aurantiacum* et de *Arthrobacter arilaitensis*, ainsi que ceux des gènes codant pour l'ARN ribosomique 26S et la bêta-tubuline de *G. candidum* et de *Debaryomyces hansenii* ont été détectés et quantifiés dans la plupart des échantillons testés. Trois types de normalisation ont été appliqués et ont permis, en fonction du type de normalisation choisi, de montrer i) l'activité de transcription du gène considéré par rapport à l'activité de transcription globale dans un fromage, ii) les différences d'abondance de transcrits entre les fromages, et iii) les différences d'abondance des transcrits par rapport à la quantité de ribosomes de l'espèce cible.

Une application intéressante de ce type d'analyses est de comparer, dans différents échantillons de fromage, l'abondance de transcrits de gènes impliqués dans les fonctionnalités de l'affinage, comme par exemple les protéases ou les lipases, ou bien au contraire de gènes liés à des propriétés indésirables telles que l'altération ou la production de toxines. Des démarches similaires ont été explorées dans des Emmentals en cours d'affinage (Falentin et al., 2010, 2012)

Conclusions

Grâce aux développements technologiques de la dernière décennie, nous commençons à obtenir une image fiable, en profondeur, de la diversité microbienne du fromage. Cependant, peu d'attention est encore accordée à la communauté "endogène" dite « maison » et à la manière dont ce microbiote se structure, survit et colonise les fromages. Quelques études décrivent la biodiversité au niveau du genre, et ont pu mettre en valeur une douzaine de genres répartis dans différentes variétés de fromage. Cependant, des études à grande échelle au niveau de l'espèce, du phylotype voire au niveau de la souche sont désormais nécessaires. Les progrès récents dans les technologies NGS rendent désormais possible ce type d'étude ambitieuse, à condition que des progrès soient également réalisés dans la résolution taxonomique des outils. Il pourrait également être intéressant d'utiliser la PCR quantitative pour quantifier plus précisément l'abondance et l'activité de certains phylotypes. Enfin, il est nécessaire de mettre l'accent sur l'adaptation écologique de l'espèce, les capacités de colonisation, la capacité à résister et / ou à s'adapter à des perturbations.

Références bibliographiques

- Abeijón Mukdsi, M.C., Falentin, H., Maillard, M.-B., Chuat, V., Medina, R.B., Parayre, S., Thierry, A., 2014. The Secreted Esterase of *Propionibacterium freudenreichii* Has a Major Role in Cheese Lipolysis. *Applied and Environmental Microbiology* 80 (2), 751-756.
- Aldrete-Tapia A., Escobar-Ramírez M.C., Tamplin M.L., Hernández-Iturriaga M., 2014. High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese. *Food Microbiology* 44 (0), 136-141.
- Alegria A., Szczesny P., Mayo B., Bardowski J., Kowalczyka M., 2012. Biodiversity in Oscypek, a Traditional Polish Cheese, Determined by Culture-Dependent and -Independent Approaches. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (6), 1890-1898.
- Almeida M., Hebert A., Abraham A.-L., Rasmussen S., Monnet C., Pons N., Delbes C., Loux V., Batto J.-M., Leonard P., Kennedy S., Ehrlich S., Pop M., Montel M.-C., Irlinger F., Renault P., 2014. Construction of a dairy microbial genome catalog opens new perspectives for the metagenomic analysis of dairy fermented products. *BMC Genomics* 15 (1), 1101.
- Beuquier E., Buchin S., 2004. Raw milk cheeses. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. P.L.H.M.T.M.C. Patrick F. Fox and P. G. Timothy, Academic Press. Volume 1: 319-345.
- Blaiseau P., Seguin A., Camadro J., Lesuisse E., 2010. Iron uptake in yeasts. *Iron Uptake and Homeostasis in Microorganisms*. Caister Academic Press, Brussels, 265-284.

- Bokulich N.A., Amiranashvili L., Chitchyan K., Ghazanchyan N., Darbinyan K., Gagelidze N., Sadunishvili T., Goginyan V., Kvesitadze G., Torok T., Mills D.A., 2015. Microbial biogeography of the transnational fermented milk matsoni. *Food Microbiology* 50 (0), 12-19.
- Bourdichon F., Casaregola S., Farrokh C., Frisvad J.C., Gerds M.L., Hammes W.P., Harnett J., Huys G., Laulund S., Ouwehand A., Powell I.B., Prajapati J.B., Seto Y., Ter Schure E., Van Boven A., Vankerckhoven V., Zgoda A., Tuijelaars S., Hansen E.B., 2012. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology* 154 (3), 87-97.
- Buchin S., Tessier L., Berthier F., Salmon J.C., Duboz G., 2004. How volatile compound profiles are modified by indigenous milk microflora in hard cooked cheeses? *IDF Symposium on Cheese: Ripening, Characterization & Technology Prague*.
- Callon C., Duthoit F., Delbès C., Ferrand M., Le Frileux Y., De Crémoux R., Montel M.-C., 2007. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: Molecular approaches. *Systematic and Applied Microbiology* 30 (7), 547-560.
- Callon, C., Millet, L., Montel, M.-C., 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *Journal of Dairy Research* 71 (02), 231-244.
- Chaves-López C., De Angelis M., Martuscelli M., Serio A., Paparella A., Suzzi G., 2006. Characterization of the Enterobacteriaceae isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). *Journal of Applied Microbiology* 101 (2), 353-360.
- Cheeseman K., Ropars J., Renault P., Dupont J., Gouzy J., Branca A., Abraham A.-L., Ceppi M., Conseiller E., Debuchy R., Malagnac F., Goarin A., Silar P., Lacoste S., Sallet E., Bensimon A., Giraud T., Brygoo Y., 2014. Multiple recent horizontal transfers of a large genomic region in cheese making fungi. *Nat. Commun.* 5. doi:10.1038/ncomms3876
- Chilliard Y., Glasser F., Ferlay A., Bernard L., Rouel J., Doreau M., 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109 (8), 828-855.
- Cogan T.M., Jamet E., Beduhn R., Bora N., Chamba J.-F., Irlinger F., Sebastiani H., Desmasures N., Hohenegger M., Mounier J., Ward A.C., Goodfellow M., Goerges S., Guéguen M., Larpin S., Swings J., Vancannet M., Gelsomino R., Rea M.C., Scherer S., 2014. Biodiversity of the Surface Microbial Consortia from Limburger, Reblochon, Livarot, Tilsit, and Gubbeen Cheeses. *Microbiol. Spectr.* 2. doi:10.1128/microbiolspec.CM-0010-2012
- Coppa M., Verdier-Metz I., Ferlay A., Pradel P., Didiene R., Farruggia A., Montel M.C., Martin B., 2011. Effect of different grazing systems on upland pastures compared with hay diet on cheese sensory properties evaluated at different ripening times. *International Dairy Journal* 21 (10), 815-822.
- Coton M., Delbès-Paus C., Irlinger F., Desmasures N., Le Fleche A., Stahl V., Montel M.-C., Coton E., 2012. Diversity and assessment of potential risk factors of Gram-negative isolates associated with French cheeses. *Food Microbiol.* 29, 88–98. doi:10.1016/j.fm.2011.08.020
- Deetae P., Mounier J., Bonnarme P., Spinnler H.E., Irlinger F., Helinck S., 2009. Effects of *Proteus vulgaris* growth on the establishment of a cheese microbial community and on the production of volatile aroma compounds in a model cheese. *Journal of Applied Microbiology* 107 (4), 1404-1413.
- Deetae P., Saint-Eve A., Spinnler H.E., Helinck S., 2011. Critical effect of oxygen on aroma compound production by *Proteus vulgaris*. *Food Chem.* 126, 134–139. doi:10.1016/j.foodchem.2010.10.089
- Delbes C., Ali-Mandjee L., Montel M.C., 2007. Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based analyses. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (6), 1882-1891.
- Delbès-Paus C., Miszczycha S., Ganet S., Helinck S., Veisseire P., Pochet S., Thévenot D., Montel M.-C., 2013. Behavior of *Escherichia coli* O26:H11 in the presence of *Hafnia alvei* in a model cheese ecosystem. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 212–218. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.019
- Delbès-Paus C., Pochet S., Helinck S., Veisseire P., Bord C., Lebecque A., Coton M., Desmasures N., Coton E., Irlinger F., Montel M.-C., 2012. Impact of Gram-negative bacteria in interaction with a complex microbial consortium on biogenic amine content and sensory characteristics of an uncooked pressed cheese. *Food Microbiol.* 30, 74–82. doi:10.1016/j.fm.2011.12.008
- 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. *Journal of Dairy Science* 97 (10), 6046-6056.
- Demarigny Y., Beuquier E., Buchin S., Pochet S., Grappin R., 1997. Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses: II. Biochemical and sensory characteristics. *Lait* 77 (1), 151-167.
- Desmasures N., Opportune W., Guéguen M., 1997. *Lactococcus* spp., yeasts and *Pseudomonas* spp. on teats and udders of milking cows as potential sources of milk contamination. *International Dairy Journal* 7 (10), 643-646.
- Didienne R., Defargues C., Callon C., Meylheuc T., Hulin S., Montel M.C., 2012. Characteristics of microbial biofilm on wooden vats ('gerles') in PDO Salers cheese. *International Journal of Food Microbiology* 156 (2), 91-101.
- Dolci P., De Filippis F., La Stora A., Ercolini D., Cocolin L., 2014. rRNA-based monitoring of the microbiota involved in Fontina PDO cheese production in relation to different stages of cow lactation. *International Journal of Food Microbiology* 185 (0), 127-135.
- Dugat-Bony E., Garnier L., Denonfoux J., Ferreira S., Bonnarne P., Irlinger, F., 2015a. Nouveau regard sur la diversité microbienne de fromages français grâce aux outils NGS. 20ème CBL, Lille, France.
- Dugat-Bony E., Straub C., Teissandier A., Onésime D., Loux V., Monnet C., Irlinger F., Landaud S., Leclercq-Perlat M.-N., Bento P., Fraud S., Gibrat J.-F., Aubert J., Fer F., Guédon E., Pons N., Kennedy S., Beckerich J.-M., Swennen D., Bonnarne P., 2015b. Overview of a Surface-Ripened Cheese Community Functioning by Meta-Omics Analyses. *Plos One* 10, e0124360. doi:10.1371/journal.pone.0124360
- Dungan R.S., 2012. Use of a culture-independent approach to characterize aerosolized bacteria near an open-freestall dairy operation. *Environment International* 41 (0), 8-14.
- Duthoit F., Godon J.J., Montel M.C., 2003. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (7), 3840-3848.
- Duthoit F., Tessier L., Montel M.C., 2005. Diversity, dynamics and activity of bacterial populations in 'Registered Designation of Origin' Salers cheese by single-strand conformation polymorphism analysis of 16S rRNA genes. *Journal of Applied Microbiology* 98 (5), 1198-1208.
- Duval P., Rifa E., Gayard C., Chauvin C., Hulin S., Bouchard P., Picque D., Montel M.-C., 2015. Dynamique microbienne de fromages Bleu d'Auvergne emballés sous-vide par méthode culture-dépendante et approche métataxogénomique. 20ème CBL, Lille, France.
- Falentin H, Postollec F, Parayre S, Henaff N, Le Bivic P, Richoux R, Thierry A, Sohler D: Specific metabolic activity of ripening bacteria quantified by real-time reverse transcription PCR throughout Emmental cheese manufacture. *Int J Food Microbiol* 2010, 144:10–19.
- Falentin H, Henaff N, Le Bivic P, Deutsch S-M, Parayre S, Richoux R, Sohler D, Thierry A, Lortal S, Postollec F: Reverse transcription quantitative PCR revealed persistency of thermophilic lactic acid bacteria metabolic activity until the end of the ripening of Emmental cheese. *Food Microbiol* 2012, 29:132–140.
- Feutry F., Oneca M., Berthier F., Torre P., 2012. Biodiversity and growth dynamics of lactic acid bacteria in artisanal PDO Ossau-Iraty cheeses made from raw ewe's milk with different starters. *Food Microbiology* 29 (1), 33-42.
- Frétin M., Ferlay A., Montel M.-C., Martin B., Delbès C., 2015. La diversité bactérienne de fromages de type Cantal mise en évidence par une approche métataxogénomique. 20ème CBL, Lille, France.
- Fricker M., Skanseng B., Rudi K., Stessl B., Ehling-Schulz M., 2011. Shift from farm to dairy tank milk microbiota revealed by a polyphasic approach is independent from geographical origin. *International Journal of Food Microbiology* 145, S24-S30.
- Gill J.J., Sabour P.M., Gong J., Yu H., Leslie K.E., Griffiths M.W., 2006. Characterization of bacterial populations recovered from the teat canals of lactating dairy and beef cattle by 16S rRNA gene sequence analysis.

- Goerges S., Mounier J., Rea M.C., Gelsomino R., Heise V., Beduhn R., Cogan T.M., Vancanneyt M., Scherer S., 2008. Commercial Ripening Starter Microorganisms Inoculated into Cheese Milk Do Not Successfully Establish Themselves in the Resident Microbial Ripening Consortia of a South German Red Smear Cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2210–2217. doi:10.1128/AEM.01663-07
- Gori K., Ryssel M., Arneborg N., Jespersen L., 2013. Isolation and Identification of the Microbiota of Danish Farmhouse and Industrially Produced Surface-Ripened Cheeses. *Microb. Ecol.* 65, 602–615. doi:10.1007/s00248-012-0138-3
- Irlinger F., In Yung S.A.Y., Sarthou A.-S., Delbès-Paus C., Montel M.-C., Coton E., Coton M., Helinck S., 2012. Ecological and aromatic impact of two Gram-negative bacteria (*Psychrobacter celer* and *Hafnia alvei*) inoculated as part of the whole microbial community of an experimental smear soft cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 332–338. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.022
- Irlinger F., Layec S., Hélinck S., Dugat-Bony E., 2015. Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, 1–11. doi:10.1093/femsle/fnu015
- Irlinger F., Loux V., Bento P., Gibrat J.-F., Straub C., Bonnarne P., Landaud, S, Monnet C., 2012. Genome Sequence of *Staphylococcus equorum* subsp. *equorum* Mu2, Isolated from a French Smear-Ripened Cheese. *J. Bacteriol.* 194, 5141–5142. doi:10.1128/JB.01038-12
- Irlinger F., Mounier J., 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 142–148. doi:10.1016/j.copbio.2009.02.016
- Kuehn J.S., Gorden P.J., Munro D., Rong R., Dong Q., Plummer P.J., Wang C., Phillips G.J., 2013. Bacterial Community Profiling of Milk Samples as a Means to Understand Culture-Negative Bovine Clinical Mastitis. *Plos One* 8 (4), e61959.
- 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, 651–660. doi:10.1139/w11-050
- Leclercq-Perlat M.-N., Picque D., Martin del Campo Barba S.T., Monnet C., 2013. Dynamics of *Penicillium camemberti* growth quantified by real-time PCR on Camembert-type cheeses under different conditions of temperature and relative humidity. *J. Dairy Sci.* 96, 4031–4040. doi:10.3168/jds.2012-6372
- Leriche F., Fayolle K., No seasonal effect on culturable pseudomonads in fresh milks from cattle herds. *Journal of Dairy Science* 95 (5), 2299-2306.
- Lessard M.-H., Viel C., Boyle B., St-Gelais D., Labrie S., 2014. Metatranscriptome analysis of fungal strains *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* reveal cheese matrix breakdown and potential development of sensory properties of ripened Camembert-type cheese. *BMC Genomics* 15, 235.
- Licitra G., Ogier J.C., Parayre S., Pediliggieri C., Carnemolla T.M., Falentin H., Madec M.N., Carpino S., Lortal S., 2007. Variability of bacterial Biofilms of the "Tina" wood vats used in the ragusano cheese-making process. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (21), 6980-6987.
- Liu W., Zheng Y., Kwok L.-Y., Sun Z., Zhang J., Guo Z., Hou Q., Menhe B., Zhang H., 2015. High-throughput sequencing for the detection of the bacterial and fungal diversity in Mongolian naturally fermented cow's milk in Russia. *BMC Microbiology* 15 (1), 45.
- Lortal S., Di Blasi A., Madec M.N., Pediliggieri C., Tuminello L., Tanguy G., Fauquant J., Lecuona Y., Campo P., Carpino S., Licitra G., 2009. Tina wooden vat biofilm: a safe and highly efficient lactic acid bacteria delivering system in PDO Ragusano cheese making. *International Journal of Food Microbiology* 132 (1), 1-8.
- Loux V, Mariadassou M, Almeida S, Chiapello H, Hammani A, Buratti, Julien J, Gendrault A, Barbe V, Aury J-M, Deutsch S-M, Parayre S, Madec M-N, Chuat V, Jan G, Peterlongo P, Azevedo V, Le Loir Y, Falentin H: Mutations and genomic islands can explain the strain dependency of sugar utilization in 21 strains of *Propionibacterium freudenreichii*. *BMC Genomics* 2015: in press.
- Mallet A., Guéguen M., Kauffmann F., Chesneau C., Sesboué A., Desmasures N., 2012. Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. *International Dairy Journal* 27 (1–2), 13-21.

- Marchand S., De Block J., De Jonghe V., Coorevits A., Heyndrickx M., Herman L., 2012. Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11 (2), 133-147.
- Mariani C., Briandet R., Chamba J.F., Notz E., Carnet-Pantiez A., Eyoug R.N., Oulahal N., 2007. Biofilm Ecology of Wooden Shelves Used in Ripening the French Raw Milk Smear Cheese Reblochon de Savoie. *Journal of Dairy Science* 90 (4), 1653-1661.
- Masoud W., Takamiya M., Vogensen F.K., Lillevang S., Abu Al-Soud W., Sorensen S.J., Jakobsen M., 2011. Characterization of bacterial populations in Danish raw milk cheeses made with different starter cultures by denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing. *International Dairy Journal* 21 (3), 142-148.
- Masoud W., Vogensen F.K., Lillevang S., Abu Al-Soud W., Sorensen 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. *International Journal of Food Microbiology* 153 (1-2), 192-202.
- McInnis E.A., Kalanetra K.M., Mills D.A., Maga E.A., 2015. Analysis of raw goat milk microbiota: Impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity. *Food Microbiology* 46 (0), 121-131.
- Michel V., Hauwuy A., Chamba J.-F., 2001. La flore microbienne de laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. *Lait* 81 (5), 575-592.
- Monnet C., Back A., Irlinger F., 2012. Growth of Aerobic Ripening Bacteria at the Cheese Surface Is Limited by the Availability of Iron. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3185–3192. doi:10.1128/AEM.00085-12
- Monnet C., Landaud S., Bonnarne P., Swennen D., 2015. Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, 1–9. doi:10.1093/femsle/fnu025
- Monnet C., Loux V., Gibrat J.-F., Spinnler E., Barbe V., Vacherie B., Gavory F., *Gourbeyre E., Siguier P., Chandler M., Elleuch R., Irlinger F., Vallaëys T., 2010. The Arthrobacter arilaitensis Re117 Genome Sequence Reveals Its Genetic Adaptation to the Surface of Cheese.* *PLoS ONE* 5, e15489. doi:10.1371/journal.pone.0015489
- Monnet C., Straub C., Castellote J., Onesime D., Bonnarne P., Irlinger F., 2013. Quantification of Yeast and Bacterial Gene Transcripts in Retail Cheeses by Reverse Transcription-Quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 469–477. doi:10.1128/AEM.02360-12
- Monnet C., Ulve V., Sarthou A.-S., Irlinger F., 2008. Extraction of RNA from Cheese without Prior Separation of Microbial Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5724–5730. doi:10.1128/AEM.00716-08
- Montel M.-C., Buchin S., Mallet A., Delbes-Paus C., Vuitton, D.A., Desmasures, N., Berthier, F., 2014. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int. J. Food Microbiol.* 177, 136–154. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019
- Mounier J., Goerges S., Gelsomino R., Vancanneyt R., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Brennan N.M., Scherer S., Swings J., Fitzgerald G., Cogan T.M., 2006. Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese. (vol 101, pg 668, 2006). *Journal of Dairy Research* 73 (4), 448-448.
- Mounier J., Monnet C., Vallaëys T., Arditi R., Sarthou A.S., Helias A., Irlinger F., 2008. Microbial interactions within a cheese microbial community. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (1), 172-181.
- O'Sullivan D.J., Cotter P.D., O'Sullivan O., Giblin L., McSweeney P.L.H., Sheehan J.J., 2015. Temporal and Spatial Differences in Microbial Composition during the Manufacture of a Continental-Type Cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 81 (7), 2525-2533.
- Oulahal N., Adt I., Mariani C., Carnet-Pantiez A., Notz E., Degraeve P., 2009. Examination of wooden shelves used in the ripening of a raw milk smear cheese by FTIR spectroscopy. *Food Control* 20 (7), 658-663.
- Price C.E., Zeyniyev A., Kuipers O.P., Kok J., 2012. From meadows to milk to mucosa – adaptation of *Streptococcus* and *Lactococcus* species to their nutritional environments. *FEMS Microbiology Reviews*, n/a-n/a.
- Quigley L., McCarthy R., O'Sullivan O., Beresford T.P., Fitzgerald G.F., Ross R.P., Stanton C., Cotter P.D., 2013. The microbial content of raw and pasteurized cow milk as determined by molecular

approaches. *Journal of Dairy Science* 96 (8), 4928-4937.

Quigley L., O'Sullivan O., Beresford T.P., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Cotter P.D., 2011. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 150 (2-3), 81-94.

Quigley L., O'Sullivan O., Beresford T.P., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Cotter P.D., 2012. High-Throughput Sequencing for Detection of Subpopulations of Bacteria Not Previously Associated with Artisanal Cheeses. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (16), 5717-5723.

Raats D., Offek M., Minz D., Halpern M., 2011. Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food Microbiology* 28 (3), 465-471.

Rasolofo E.A., St-Gelais D., LaPointe G., Roy D., 2010. Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *International Journal of Food Microbiology* 138 (1-2), 108-118.

Ravva S.V., Sarreal C.Z., Mandrell R.E., 2011. Bacterial Communities in Aerosols and Manure Samples from Two Different Dairies in Central and Sonoma Valleys of California. *Plos One* 6 (2), e17281.

Rossi F., Gatto V., Sabattini G., Torriani S., 2012. An assessment of factors characterising the microbiology of Grana Trentino cheese, a Grana-type cheese. *International Journal of Dairy Technology* 65 (3), 401-409.

Saubusse M., Millet L., Delbès C., Callon C., Montel M.C., 2007. Application of Single Strand Conformation Polymorphism — PCR method for distinguishing cheese bacterial communities that inhibit *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 116 (1), 126-135.

Schröder J., Maus I., Trost E., Tauch A., 2011. Complete genome sequence of *Corynebacterium variabile* DSM 44702 isolated from the surface of smear-ripened cheeses and insights into cheese ripening and flavor generation. *BMC Genomics* 12, 545. doi:10.1186/1471-2164-12-545

Settanni L., Di Grigoli A., Tornambé G., Bellina V., Francesca N., Moschetti G., Bonanno A., 2012. Persistence of wild *Streptococcus thermophilus* strains on wooden vat and during the manufacture of a traditional Caciocavallo type cheese. *International Journal of Food Microbiology* 155 (1-2), 73-81.

Thierry A., Deutsch S.M., Falentin H., Dalmaso M., Cousin F., Jan G., 2011. New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. *Int J Food Microbiol* 149:18-27

Vacheyrou M., Normand A.C., Guyot P., Cassagne C., Piarroux R., Bouton Y., 2011. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *International Journal of Food Microbiology* 146 (3), 253-262.

Verdier-Metz I., Gagne G., Bornes S., Monsallier F., Veisseire P., Delbes-Paus C., Montel M.C., 2012. Cow Teat Skin, a Potential Source of Diverse Microbial Populations for Cheese Production. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (2), 326-333.

Verdier-Metz I., Michel V., Delbes C., Montel M.C., 2009. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiology* 26 (3), 305-310.

Winkelmann G., 2007. Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *BioMetals* 20 (3-4), 379-392.

Wolfe B.E., Button J.E., Santarelli M., Dutton R.J., 2014. Cheese Rind Communities Provide Tractable Systems for *In Situ* and *In Vitro* Studies of Microbial Diversity. *Cell* 158, 422-433. doi:10.1016/j.cell.2014.05.041

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « *Innovations Agronomiques* », la date de sa publication, et son URL