



Construction de la qualité sensorielle des fromages de type Cantal : rôle des interactions entre les communautés microbiennes et la composition de la matière grasse laitière des fromages

Marie Frétin

► To cite this version:

Marie Frétin. Construction de la qualité sensorielle des fromages de type Cantal : rôle des interactions entre les communautés microbiennes et la composition de la matière grasse laitière des fromages. Alimentation et Nutrition. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2016. Français. NNT : 2016CLF22776 . tel-01912424

HAL Id: tel-01912424

<https://theses.hal.science/tel-01912424>

Submitted on 5 Nov 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Blaise Pascal
N° D.U. 2776

Université d'Auvergne
ANNEE 2016

ECOLE DOCTORALE SCIENCE DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT
N° D'ORDRE 708

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(SPECIALITE NUTRITION ET SCIENCES DES ALIMENTS)

14 décembre 2016

Marie Frétin

**Construction de la qualité sensorielle des fromages de type
Cantal : rôle des interactions entre les communautés microbiennes
et la composition de la matière grasse laitière des fromages**

Directeur de thèse : Bruno MARTIN

Co-encadrantes : Céline DELBES et Anne FERLAY

<u>Président du jury</u>	Mr Téséphore SIME-NGANDO	Directeur de recherche UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal
<u>Rapporteurs</u>	Mme Nathalie DESMASURES	Professeur Université de Caen Normandie, Caen
	Mme Anne THIERRY	Chargée de recherche INRA UMR 1253, Rennes
<u>Examineurs</u>	Mr Pascal BONNARME	Directeur de recherche INRA UMR 782, Thiverval-Grignon
	Mr Bruno MARTIN	Ingénieur de recherche INRA UMR 1213, Theix
	Mme Céline DELBES	Chargée de recherche INRA UR 545, Aurillac

Unité de Recherches Fromagères (UR 545, URF, INRA)
Unité Mixte de Recherches sur les Herbivores (UMR 1213, PERAQ, INRA)

Résumé

Construction de la qualité sensorielle des fromages de type Cantal : rôle des interactions entre les communautés microbiennes et la composition de la matière grasse laitière des fromages

La qualité sensorielle des fromages au lait cru est variable selon la nature de l'alimentation des vaches laitières mais les mécanismes sous-jacents sont encore mal élucidés. Cette thèse avait pour objectif d'étudier les rôles respectifs et les interactions des composantes biochimique et microbiologique du lait, modulées par l'alimentation des vaches, dans la construction des caractéristiques sensorielles des fromages. Dans un premier temps, nous avons fait varier à la fois la composition biochimique et la composition microbiologique des laits en nous appuyant sur une expérimentation long terme comparant deux systèmes de pâturage qualifiés « d'extensif » (EXT) et de « semi-intensif » (SEMI). La structure des communautés bactériennes de la peau des trayons des vaches laitières, et dans une moindre mesure, celle des laits et des fromages de type Cantal ont varié selon les systèmes de production. Nos résultats confirment que le trayon est un réservoir potentiel de diversité microbienne, non seulement pour le microbiote du lait mais aussi pour celui du fromage. Les fromages EXT étaient caractérisés par une texture fondante et collante et une croûte moins épaisse comparativement aux fromages SEMI. Cependant, les deux systèmes de pâturage ont eu peu d'effet sur la flaveur des fromages, peut-être en raison de la trop grande similarité de la composition biochimique et microbiologique des laits des deux systèmes. Dans un deuxième temps, nous avons fait varier uniquement et de manière accentuée la composition de la matière grasse laitière *via* l'alimentation des vaches (herbe pâturée *versus* ensilage de maïs). Dans cette optique, des fromages de type Cantal ont été fabriqués à partir de deux crèmes pasteurisées de composition en acides gras différente et du même lait écrémé. Nous avons montré que l'effet de l'alimentation des vaches sur la texture des fromages était particulièrement lié à la composition de la matière grasse laitière tandis que celle-ci jouait un rôle mineur dans le développement de la flaveur des fromages. La crème la plus riche en acides gras saturés a été associée à une abondance relative plus élevée des ferments bactériens/fongiques et des OTUs dominants sur la surface des fromages et à la formation d'une croûte plus épaisse. Par comparaison, la croûte des fromages fabriqués avec une crème riche en acides gras insaturés était caractérisée par une plus grande diversité fongique et par la présence d'espèces sous-dominantes en abondance relative plus élevée. Cette thèse apporte des connaissances nouvelles sur l'effet de la composition de la matière grasse laitière sur les équilibres microbiens et le développement des caractéristiques sensorielles des fromages, et plus spécifiquement sur l'influence des deux composantes biochimique et microbiologique sur l'aspect de la croûte des fromages affinés.

Mots-clés : assemblage du microbiote, matière grasse laitière, caractéristiques sensorielles des fromages, système de production laitier au pâturage, peau des trayons des vaches, métagénétique

Abstract

Development of sensory quality of Cantal-type cheeses: effect of interaction between microbial communities and the composition of milk fat in cheeses

The sensory quality of raw milk cheeses varies according to cow diet but the underlying mechanisms are still poorly understood. The aim of this PhD work was to understand the respective roles and possible interactions between the biochemical and microbiological milk components, modulated by cow diet, on the development of the sensory properties of cheeses. In the frame of a long term experiment comparing two groups of cows managed in two grazing systems qualified of “extensive” (EXT) or “semi-intensive” (SEMI), we made Cantal-type cheeses using milk varying both in its biochemical and microbial composition. The structure of the bacterial communities of the teat skin of dairy cows, and to a lesser extent, that of milk and cheese varied according to the production systems. Our results confirm that the teat skin is a potential reservoir of microbial diversity not only for the microbiota of milk but also for cheese. The EXT cheeses were characterized by a more melting and sticky texture and a thinner rind compared to the SEMI cheeses. However, due to the similarity of the biochemical and microbiological composition of the milks from both systems, the flavour of the resulting cheeses was little impacted. Therefore, we designed a second trial aiming at controlling the microbial composition of milk and accentuating the difference of milk fat composition, *via* cow diet (maize silage vs pasture). We made Cantal-type cheeses from two pasteurized creams with different fatty acid profiles added to the same skimmed milk. The milk fat composition had a strong influence on cheese texture but it played a minor role on the development of cheese flavour. The cream rich in saturated fatty acids was associated to a higher relative abundance of bacterial / fungal starter strains and of dominant OTUs on the surface of cheese, and to the development of a thicker rind. By comparison, the rind of cheeses made with the cream rich in unsaturated fatty acids was characterized by a higher fungal diversity and the presence of sub-dominant species in greater relative abundance. This thesis provides new knowledge on the effect of the composition of milk fat on the microbial balance and on the development of the sensory characteristics of cheeses, and more specifically on the influence of both biochemical and microbiological components of milk on the aspect of the rind of mature cheeses.

Keys words: microbiota assembly, milk fat, cheese sensory properties, grazing based dairy system, cow teat skin, metabarcoding

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé conjointement au sein de l'Unité de Recherches fromagères (UR 545, INRA Aurillac) et de l'équipe PERAQ (Pratiques d'Elevage, Robustesse, Adaptation et Qualité des produits, UMR 1213, INRA Theix). Je tiens à remercier la Région Auvergne pour la bourse régionale qui a permis de financer mes travaux de thèse.

Un grand MERCI à mes trois encadrants Céline Delbès, Bruno Martin et Anne Ferlay pour m'avoir conseillé et guidé dans mes travaux, pour votre confiance et vos encouragements au cours de ces trois années, et votre investissement dans la correction du manuscrit et des articles. Céline, un merci particulier, pour ta disponibilité et ta gentillesse qui m'ont permis de relativiser dans les moments difficiles.

Sincères remerciements à Anne Thierry et Nathalie Desmasures pour avoir accepté d'être rapporteuses de cette thèse. Je vous remercie pour votre temps et vos remarques avisées. Je remercie également Télésphore Sime-Ngando pour avoir accepté de présider le jury et Pascal Bonnarne pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

J'adresse ensuite mes remerciements aux membres du comité de thèse pour leurs précieux conseils : Anne De La Foye (UMR 1213, Plate-forme d'exploration du métabolisme, INRA Theix), Erwan Engel (UR 370, QuaPA, INRA Theix), Claude Genot (UR 1268, BIA, INRA Nantes), Christophe Monnet (UMR 782, GMPA, INRA Grignon) et Anne Thierry (UMR 1253, STLO, INRA Rennes).

Mes remerciements vont ensuite aux différentes personnes que j'ai pu côtoyer pendant ma thèse dans les différentes équipes et sans qui tous ces résultats n'auraient jamais pu voir le jour.

Aux personnels des équipes AGL et Sybel (aujourd'hui PERAQ, UMR 1213, INRA Theix) pour toutes les analyses qui n'étaient pas de la microbio, votre convivialité, votre sympathie et votre bonne humeur lors de mon cours séjour à l'INRA de Theix. Merci à Emilie Tixier, Isabelle Constant, Yannick Faulconnier, Carole Delavaud, Didier Bany, Cyril Labonne, Anne Farruggia, Dominique Pomiès, Bertrand, Julien, Lehna et Jean-Baptiste.

Aux personnels de l'Herbipôle (UE 1414, INRA Marcenat) pour la gestion des animaux sans lesquels cette thèse n'aurait jamais abouti. Merci à Philippe Pradel, Florence Fournier, Carole Cirié et Olivier Troquier pour m'avoir accompagné sur le terrain, au plus près des vaches, ce fut une expérience mémorable pour moi.

Aux personnels de l'IUT d'Aurillac pour leur bienveillance et pour m'avoir permis de découvrir l'envers du décor dans l'enseignement supérieur. Merci Geneviève Gagne, Stéphanie Bornes, Philippe Veisseire, Cécile Moussard, Valérie Polonais.

Je remercie aussi ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'avancé de ce projet : Cécile Bord (UR Calityss, VetAgro Sup, Lempdes) pour m'avoir formé à l'analyse sensorielle et son expertise dans le traitement des données, Solange Buchin (UR 342, URTAL, INRA Poligny) pour l'analyse des composés volatils et des AGV, Christelle Lopez (UMR 1253, STLO, INRA Rennes) pour l'analyse des globules gras du lait, Olivier Zemb, Sylvie Combes et Béatrice Gabinaud

(UMR 1388, GenPhySE, équipe NED, INRA Castanet-Tolosan) pour leur appui scientifique et technique lors des séquençage MiSeq, Valetin Loux et Olivier Rué (UR 1404, MaIAGE, INRA Jouy-en-Josas) pour leur compétence en bioinformatique, Eric Dugat-Bony (UMR 782, GMPA, INRA Grignon) pour tous tes conseils indispensables dans la mise au point du protocole de « metabarcoding ».

La suite de mes remerciements va à mes collègues et amis de l'INRA d'Aurillac.

Merci Béa (avec « B » en majuscule) pour tes conseils et ta longue expérience en microbiologie au labo, pour la préparation du café à 10h, pour ta gentillesse et pour ton écoute lors de notre cohabitation dans le même bureau.

Merci Cécile pour ce magnifique chef-d'œuvre, même si tu as un peu plagié mon œuvre (oui, parfois dans une thèse, on fait un peu d'art abstrait).

Merci Céline G. pour ta bonne humeur, le chocolat et les petits gâteaux qui ont été d'un grand réconfort lors de la rédaction et pour avoir répondu à toutes mes questions concernant la paperasse administrative.

Merci Etienne pour ton implication dans le traitement statistique et bioinformatique de mes données, ton aide et ta disponibilité ont été précieuses au cours de ces trois années

Merci Isabelle pour ton implication dans ce projet et pour tous les trajets de la rue du Château Saint-Etienne (avant la grande montée) jusqu'à l'INRA et de l'INRA jusqu'au feu du boulevard d'Aurinques, le matin, le midi et parfois le soir.

Merci René pour m'avoir appris à fabriquer un Cantal de A à Z avec tous les aléas d'une fromagerie, pour toutes tes anecdotes d'une lointaine époque et pour me rappeler le lundi matin que les rugbymans du stade aurillacois ont battu les montois pendant le weekend.

Merci aux trois filles (Caroline, Sophie et Fabienne) du Pole fromager AOC Massif Central pour votre sympathie et votre générosité.

Merci à mes deux acolytes de bureau, 2 ans pour Pierre et 2 ans ½ pour Perrine, devenus Docteurs avant moi, pour votre accueil, pour vos conseils de thésard à thésard, pour nos discussions scientifiques ou pas et pour tous les moments partagés ensemble au labo et à l'extérieur.

Je n'oublie pas les deux stagiaires que j'ai eu le plaisir d'encadrer : Delphine (tu resteras toujours la 1^{ère}) et Martin, ce fut un réel plaisir de partager ces quelques mois avec vous.

Enfin Merci à Marie-Christine Montel, directrice de l'INRA d'Aurillac, et à son successeur Christophe Chassard, de m'avoir permis de réaliser cette thèse dans un environnement aussi agréable (au milieu des vaches !).

Je souhaite adresser une dédicace spéciale aux aurillacois : Adrian, Alexia, Clothilde, Etienne, Mélanie, Pierre (et Plume), Pierre, Perrine, Rémy avec qui j'ai partagé de nombreux verres et repas, mais aussi des randos, des moments de détente, des fous rires et la découverte du molky. Je vous remerci chaleureusement !

Je pense également à ceux avec qui cette aventure à commencer (oui je parle de ma thèse) au mois de juillet 2013 à Prignonieux dans la Maison des stagiaires ou une fabuleuse collocation d'une quinzaine de personnes, je ne vous ai pas oublié Anaïs, Audrey, Charline, Chloé, Hélène, Louise, Lucie, Mélanie, Pauline, Rebecca et nos deux mecs Florian et Loïc.

Ensuite, mes remerciements vont à mes plus proches amis, Lucile & Charlie pour la confiance que vous m'avez témoignée en me donnant le privilège d'être témoin de votre mariage et

pour m'offrir la joie immense d'être la marraine d'Albane. Quel bonheur ! A Louis & Cécile pour ce week-end de folie qu'on a passé à Londres (1^{ère} fois que je prenais l'avion !), merci Louis de m'avoir si souvent hébergé quand j'étais de passage à Clermont, merci Cécile pour tous les beaux souvenirs (la liste est trop longue) depuis la licence à Bordeaux et tous ceux à venir... Encore merci à Julia et à Jess qui m'ont fait le plaisir de me rendre visite à Aurillac

Je vais terminer par ceux qui me soutiennent depuis des années, et particulièrement pendant ces trois années : Ma Famille. Mes parents qui ont toujours été présents au cours de mes études, merci Maman, merci Papa, pour votre soutien sans faille, mes grands-mères Josiane et Jacqueline à qui je pense très fort, mon défunt papy qui je sais aurait été extrêmement ravi d'être parmi nous et fier de sa petite-fille.

A mes parents, Merci, je vous dédie cette thèse

Table des matières

Liste des figures	15
Liste des tableaux	17
Liste des abréviations	19
Introduction	21
Partie I : Contexte scientifique	27
1. Du lait aux fromages affinés : la construction des caractéristiques biochimiques et sensorielles	29
1.1. Composition du lait	29
1.1.1. Influence de l'alimentation des animaux	31
1.1.2. Caractéristiques de l'animal	32
1.2. Elaboration des caractéristiques sensorielles des fromages	32
1.2.1. Texture des fromages	32
1.2.2. Apparence des fromages	33
1.2.3. Flaveur des fromages	34
2. Composition, origine et diversité de la communauté microbienne des laits et des fromages	37
2.1. Les grands groupes microbiens et leurs principales fonctions	37
2.1.1. Les bactéries lactiques	37
2.1.2. Les levures et moisissures	39
2.1.3. La communauté bactérienne de surface	39
2.2. Les sources de microorganismes du lait et du fromage	41
2.3. Stratégies d'étude des écosystèmes microbiens laitiers	43
2.3.1. Méthodes conventionnelles	43
2.3.2. Détermination de profils de diversité, indépendamment de la culture à l'aide de marqueurs phylogénétiques	45
2.3.3. Apports du séquençage à haut débit à la connaissance des écosystèmes microbiens des laits, fromages et environnements de production	47
3. Liens entre la composition microbiologique, la composition biochimique et les caractéristiques sensorielles des fromages	59
3.1. Voies métaboliques mises en jeu au cours de l'affinage des fromages	59
3.1.1. Glycolyse	59
3.1.2. Protéolyse	61
3.1.3. Lipolyse	63
3.2. La composition biochimique de la matière grasse laitière peut-elle influencer la croissance et la diversité du microbiote des fromages ?	65
3.2.1. Effet de la teneur en matière grasse des fromages	67
3.2.2. Effet de la composition de la matière grasse laitière	67
4. Synthèse générale	73

Partie II : Objectifs et stratégie scientifique	75
1. Problématique	77
2. Hypothèses de recherche et objectifs	79
3. Stratégie et moyens mis en œuvre	81
Partie III : Matériel et méthodes	83
1. Les dispositifs expérimentaux et les fabrications fromagères	85
1.1. Dispositif expérimental « système » au pâturage	85
1.2. Dispositif expérimental avec deux régimes alimentaires différents	85
2. Les analyses	87
2.1. Analyses physico-chimiques du lait	87
2.2. Analyses physico-chimiques du fromage	87
2.3. Analyses en acides gras totaux, en acides gras volatils et en acides gras libres	87
2.4. Analyse en composés volatils	87
2.5. Analyses microbiologiques	89
2.6. Analyse “metabarcoding”	89
2.7. Analyses sensorielles	90
2.8. Analyses statistiques	90
Partie IV : Résultats	93
Article 1 : The effects of low-input grazing systems and milk pasteurisation on the chemical composition, microbial communities, and sensory properties of uncooked pressed cheeses	95
Article 2 : Bacterial community assembly from cow teat skin to ripened cheeses according to the grazing systems	109
Effet de la matière grasse laitière sur la dynamique des communautés bactériennes et fongiques au cours de l’affinage des fromages, et leur interaction sur les caractéristiques sensorielles des fromages	131
1. Résultats	133
1.1. Effets d’une modification de la composition de la matière grasse laitière sur les composantes biochimique, microbiologique et sensorielle des laits aux fromages	133
1.1.1. Laits crus et pasteurisés	133
1.1.2. Fromages au lait cru et au lait pasteurisé	133
1.1.3. Caractéristiques sensorielles des fromages au lait cru et au lait pasteurisé	141
1.2. Dynamique de la communauté microbienne dans les fromages au cours de l’affinage selon la composition en acides gras de la matière grasse laitière	143
1.2.1. Diversité alpha dans les fromages au lait cru et au lait pasteurisé selon l’origine de la crème	143
1.2.2. Effet de la matière grasse laitière sur la communauté fongique de la croûte des fromages au lait cru ou pasteurisé	143
1.2.4. Effet de la matière grasse laitière sur la communauté bactérienne de la pâte des fromages au lait cru ou pasteurisé à 150 jours d’affinage	152

2. Discussion	156
2.1. Effet de la composition de la matière grasse laitière sur les caractéristiques sensorielles des fromages	156
2.2. Effet de la composition de la matière grasse sur les équilibres microbiens à la surface des fromages	159
Partie V : Discussion générale et perspectives	161
1. Assemblage de la communauté bactérienne des trayons des vaches jusqu'aux fromages affinés	163
2. Construction des caractéristiques sensorielles des fromages en lien avec les composantes biochimique et microbiologique du lait	166
2.1. Flaveur	166
2.2. Texture	167
2.3. Apparence	168
Références	171
ANNEXES	186
Annexe 1: Supplementary Data related to the article The effects of low-input grazing systems and milk pasteurisation on the chemical composition, microbial communities, and sensory properties of uncooked pressed cheeses	189
Annexe 2: Supplementary Data related to the article Bacterial community assembly from cow teat skin to ripened cheeses according to the grazing systems	199
Annexe 3 : Tableaux supplémentaires correspondants aux résultats du dispositif 2	215
Annexe 4 : Définitions des descripteurs sensoriels du Cantal	221
Annexe 5 : Liste des communications	223

Liste des figures

Figure 1. Classification des fromages	23
Figure 2. Composition moyenne du lait de vache	28
Figure 3. Consommation mondiale A) de lait liquide et B) de fromage en 2014	28
Figure 4. Distribution des principaux acides gras de la matière grasse du lait de vache	30
Figure 5. Vue globale de la succession des principaux groupes microbiens et de leurs fonctions au cours de la fabrication des fromages	36
Figure 6. Principales sources de micro-organismes du lait	40
Figure 7. Structure des opérons ribosomiaux (A) gène de l'ARNr 16S des procaryotes et (B) opéron ribosomal fongique	44
Figure 8. Méthodes culture-indépendantes pour étudier la diversité et les activités microbiennes	46
Figure 9. Les principales voies biochimiques conduisant à la production de composés aromatiques au cours de l'affinage des fromages	58
Figure 10. Vue générale de la conversion des protéines en acides aminés (protéolyse), puis en composés impliqués dans la formation de composés aromatiques	60
Figure 11. Principales voies de dégradation des acides aminés libres	60
Figure 12. Principales voies cataboliques des acides gras libres dans les fromages (lipolyse)	62
Figure 13. Stratégie adoptée pour répondre aux objectifs associés à chaque dispositif.	80
Figure 14. Expérimentation système maximisant l'utilisation de l'herbe : système extensif (EXT) <i>versus</i> système semi-intensif (SEMI) (Dispositif 1)	84
Figure 15. Dispositif expérimental élaboré pour obtenir des laits avec une composition en acides gras différente : pâturage (PAT) <i>versus</i> ensilage de maïs (MAIS) (Dispositif 2)	84
Figure 16. Workflow et paramètres appliqués pour l'analyse des données de "metabarcoding" concernant l'étude de la communauté bactérienne et de la communauté fongique	88
Figure 17. Composition en acides gras des laits crus (A) et pasteurisés (B) utilisés pour la fabrication des fromages au lait cru et au lait pasteurisé	132
Figure 18. Niveau de lipolyse dans la pâte et la croûte des fromages au lait cru et au lait pasteurisé en fin d'affinage (à 150 jours d'affinage)	137
Figure 19. Abondance relative moyenne des OTUs les plus abondants dans les fromages au lait cru (A-B) et au lait pasteurisé (C-D) avec une crème PAT ou une crème MAIS au cours de l'affinage (30, 90 et 150 jours d'affinage)	145
Figure 20. Analyse discriminante PLS réalisée sur l'abondance relative des 15 OTUs fongiques détectés dans 18 échantillons de croûte des fromages au lait cru avec une matière grasse laitière riche en AGI (lot PAT) ou riche en AGS (lot MAIS) au cours de l'affinage (30, 90 et 150 jours d'affinage)	146
Figure 21. Analyse discriminante PLS réalisée sur l'abondance relative des 14 OTUs fongiques détectés dans 18 échantillons de croûte des fromages au lait pasteurisé avec une matière grasse laitière riche en AGI (lot PAT) ou riche en AGS (lot MAIS) au cours de l'affinage (30, 90 et 150 jours d'affinage)	147
Figure 22. Analyse discriminante PLS réalisée sur l'abondance relative des 57 OTUs bactériens détectés dans 18 échantillons de croûte des fromages au lait cru avec une matière grasse laitière riche en AGI (lot PAT) ou riche en AGS (lot MAIS) au cours de l'affinage (30, 90 et 150 jours d'affinage)	150
Figure 23. Analyse discriminante PLS réalisée sur l'abondance relative des 39 OTUs bactériens détectés dans 18 échantillons de croûte des fromages au lait pasteurisé avec une matière grasse laitière riche en AGI (lot PAT) ou riche en AGS (lot MAIS) au cours de l'affinage (30, 90 et 150 jours d'affinage)	151
Figure 24. Comparaison de la distribution des OTUs bactériens selon l'origine de la matière grasse laitière entre la croûte et la pâte des fromages au lait cru à 150 jours d'affinage.	154

Figure 25. Comparaison de la distribution des OTUs bactériens selon l'origine de la matière grasse laitière entre la croûte et la pâte des fromages au lait pasteurisé à 150 jours d'affinage. ----- 155

Liste des tableaux

Tableau 1. Synthèse des études de séquençage à haut débit sur les communautés microbiennes des trayons, des laits et des fromages, en incluant les principaux paramètres techniques et les découvertes majeures-----	48
Tableau 2. Synthèse des études concernant l'effet de la teneur en matière grasse sur la communauté microbienne des fromages à pâte pressée non cuite (PPNC).-----	66
Tableau 3. Synthèse des études réalisées dans la matrice laitière et/ou fromagère concernant l'effet de certains acides gras libres et monoesters sur des microorganismes potentiellement présents dans les produits laitiers -----	70
Tableau 4. Composition globale et niveau des principaux groupes microbiens du lait de cuve selon l'origine de la crème -----	134
Tableau 5. Profil en acides gras totaux et en acides gras libres sur la croûte des fromages en fin d'affinage (à 150 jours d'affinage) selon l'origine de la crème -----	136
Tableau 6. Concentration en acides gras de la pâte des fromages selon l'origine de la crème au cours de l'affinage -----	137
Tableau 7. Composition globale, rhéologie et couleur des fromages selon l'origine de la crème-----	138
Tableau 8. Composés volatils identifiés dans les fromages pour lesquels l'origine de la crème a eu un effet significatif -----	139
Tableau 9. Niveau de population des principaux groupes microbiens dans la pâte des fromages au lait cru selon l'origine de la crème au cours de l'affinage -----	140
Tableau 10. Niveau de population des principaux groupes microbiens dans la pâte des fromages au lait pasteurisé selon l'origine de la crème au cours de l'affinage -----	140
Tableau 11. Caractéristiques sensorielles des fromages en fin d'affinage (à 150 jours d'affinage) -----	142
Tableau 12. Alpha-diversité dans le lait cru et les fromages au lait cru au cours de l'affinage (30, 90 et 150 jours d'affinage) selon l'origine de la matière grasse -----	144
Tableau 13. Alpha-diversité dans les fromages au lait pasteurisé au cours de l'affinage (30, 90 et 150 jours d'affinage) selon l'origine de la matière grasse -----	144

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AGL	Acides gras libres
AOP	Appellation d'Origine Protégée
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
AGI	acides gras insaturés
AGMI	acides gras mono-insaturés
AGPI	acides gras polyinsaturés
AGS	acides gras saturés
AGV	acides gras volatils
ANOVA	<i>ANalysis Of Variance</i> (en français, analyse de la variance)
AOP	Appellation d'Origine Protégée
Aw	activité de l'eau
C6:0	acide caproïque
C8:0	acide caprylique
C10:0	acide caprique
C12:0	acide laurique
C14:0	acide myristique
C16:0	acide palmitique
C18:0	acide stéarique
C16:1n-7	acide palmitoléique
C18:1cis9	acide oléique
C18:1trans11	acide vaccénique
C18:2cis9trans11	acide ruménique
C18:2n-6	acide linoléique
C18:3n-3	acide linolénique
CFU	<i>Colony Forming Unit</i> (en français, UFC : Unité Formant Colonie)
CLA	<i>Conjugated linoleic acid</i> (en français, acide linoléique conjugué)
dNTPs	désoxyribonucléotides triphosphates
EXT	système extensif (dispositif 1)
FISH	<i>Fluorescence in situ in hybridation</i> (en français, hybridation in situ en fluorescence)
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
LAB	<i>Lactic acid bacteria</i> (en français, bactéries lactiques)
LPL	lipoprotéine lipase
MAIS	alimentation ensilage de maïs (dispositif 2)
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i> (en français, séquençage de nouvelle génération)
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i> (en français, unité taxonomique opérationnelle)
PAT	alimentation au pâturage (dispositif 2)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (en français, réaction en chaîne par polymérase)
PLS-DA	<i>Partial Least Square Discriminant Analysis</i> (en français, analyse discriminante des moindres carrés partiels)
PM	fromage à pâte molle
PPC	fromage à pâte pressée cuite

PPNC	fromage à pâte pressée non cuite
SEMI	système semi-intensif (dispositif 1)
UNITE	User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza Database
WGS	<i>Whole genome sequencing</i> (en français, séquençage du génome entier)

Introduction



Figure 1. Classification des fromages adaptée de Almena-Aliste and Mietton (2014)
¹ fromages au lait de brebis ; ² fromages au lait de chèvre ; **en gras** : fromages avec une Appellation d'Origine Protégée (AOP) ; en noir : fromages cités dans le texte

La qualité et la diversité des caractéristiques sensorielles des fromages résultent d'une combinaison unique entre la composition de la matière première, les communautés microbiennes, les procédés de fabrication et les caractéristiques du terroir avec les savoir-faire locaux. Sur le territoire français, plus de 1200 variétés de fromages sont dénombrées dont 45 bénéficient d'une Appellation d'Origine Protégée (AOP). Ces fromages peuvent être classés en 5 grandes familles selon leur procédé technologique : pâte fraîche, pâte molle (PM), pâte persillée, pâte pressée non cuite (PPNC) et pâte pressée cuite (PPC) (**Figure 1**).

Dans les zones de montagne, les filières fromagères bénéficiant d'une AOP jouent un rôle primordial pour assurer la viabilité économique des exploitations laitières. Elles génèrent une plus-value qui permet aux acteurs de la filière de faire face aux surcoûts de production et de collecte du lait. Dans ce contexte, la maîtrise de la qualité du fromage est primordiale pour que le prix de vente supérieur de ces fromages repose sur une réalité tangible. La maîtrise des différentes dimensions de la qualité intrinsèque des fromages (composition chimique, qualité sensorielle, nutritionnelle et hygiénique) dépend à la fois de la maîtrise du procédé de fabrication et de la matière première mise en œuvre. Le rôle des caractéristiques du lait sur les différentes dimensions de la qualité des fromages est d'autant plus important que les possibilités de modifier les caractéristiques initiales des laits sont plus faibles. C'est le cas notamment des fromages fermiers et/ou au lait cru. Dans ce cas, la diversité et l'originalité de la matière première doivent être respectées de façon à ce que le fromage reflète au mieux l'ensemble des composantes du terroir où le lait est produit et transformé en fromages.

Dans le contexte territorial spécifique de la moyenne montagne Auvergnate, les systèmes d'élevage laitier disposent d'une importante ressource herbagère. Du point de vue des consommateurs, l'herbe renvoie à une image saine et à la préservation de la biodiversité. Les atouts des régimes à base d'herbe sur les qualités sensorielle et nutritionnelle des fromages sont maintenant bien établis (Coppa et al., 2011a, 2011b; Coulon et al., 2004; Martin et al., 2005) mais ces effets ne sont que partiellement compris. Ils semblent liés en partie au microbiote du lait cru dans la mesure où lorsque le lait est pasteurisé, les effets des régimes alimentaires sont réduits (Verdier-Metz et al., 2002). Le développement des communautés microbiennes dans le fromage dépend en partie de leur présence dans le lait cru dont les facteurs de variation restent encore très mal compris. De multiples sources peuvent être à l'origine de l'ensemencement du lait telles que l'environnement des animaux (eau, air, litière, alimentation), les animaux eux-mêmes (peau des trayons) et le matériel de traite. De manière générale, la peau des trayons en contact avec le matériel de traite apparaît comme un vecteur majeur de microorganismes de par les nombreuses espèces bactériennes recensées sur sa surface (Verdier-Metz et al., 2012a). Malgré une charge bactérienne importante dans les différents

compartiments de l'étable (air, poussière, foin, peau des trayons), seul un tiers de la diversité bactérienne identifiée dans le lait pourrait provenir de ces différentes sources (Vacheyrou et al., 2011) ce qui suggère que les populations microbiennes de l'ambiance des étables et de la peau des trayons ne sont pas les seules sources de micro-organismes du lait. Les connaissances sur les différents réservoirs de diversité microbienne du lait caractérisant les systèmes de production sont encore insuffisantes, notamment pour comprendre les éventuels transferts microbiens au travers de ce continuum d'écosystèmes. Par ailleurs, la composition biochimique de la matière première, en particulier la matière grasse laitière, peut être modulée par le régime alimentaire des vaches (Chilliard et al., 2007; Couvreur et al., 2006; Ferlay et al., 2006, 2008). Les micro-organismes présents dans le lait et le fromage interviennent dans le catabolisme des acides gras (lipolyse et oxydation des acides gras) grâce à leur potentiel enzymatique (lipase, estérase). En retour, le développement des communautés microbiennes dans le fromage pourrait être modifié par la composition biochimique du lait, entre autres en raison des propriétés antimicrobiennes potentielles d'acides gras issus du lait. Toutefois, l'interaction entre la composition en acides gras du lait et les équilibres microbiens reste à explorer.

Ce manuscrit de thèse débutera par une revue de la littérature sur la construction des caractéristiques sensorielles des fromages en fonction de l'alimentation des vaches laitières (chapitre 1). Nous présenterons ensuite un état des connaissances sur la composition et l'origine des communautés microbiennes des laits et des fromages en mettant en avant l'apport des nouvelles techniques de séquençage à haut-débit dans l'étude de ces communautés (chapitre 2). Nous consacrerons le dernier chapitre au rôle des microorganismes dans les voies métaboliques impliquées dans la maturation des fromages ainsi qu'aux effets potentiels de la matière grasse sur le microbiote au cours de l'affinage (chapitre 3). La deuxième partie consistera à présenter les objectifs de ces travaux de thèse et la stratégie mise en œuvre pour y répondre. Les dispositifs expérimentaux seront détaillés dans une troisième partie. Dans la quatrième partie, nous exposerons les résultats sur les effets conjoints des composantes biochimique et microbiologique du lait sur les caractéristiques sensorielles des fromages en nous appuyant sur deux systèmes de production du lait maximisant l'utilisation de l'herbe. Puis, sur la base de ces deux systèmes, nous présenterons la première étude sur l'assemblage des communautés bactériennes des trayons jusqu'aux fromages au lait cru réalisée en utilisant l'approche « metabarcoding ». Enfin, nous évoquerons les effets de la matière grasse laitière sur la dynamique des communautés bactériennes et fongiques au cours de l'affinage ainsi que l'effet de leur interaction sur les caractéristiques sensorielles des fromages. Dans la cinquième partie, nous discuterons des résultats acquis sur l'assemblage des communautés bactériennes des trayons

jusqu'aux fromages, ainsi que du rôle de la composition biochimique du lait, principalement de la matière grasse laitière, et de la composition des communautés microbiennes sur la flaveur, la texture et l'aspect de la croûte des fromages.

Contexte scientifique

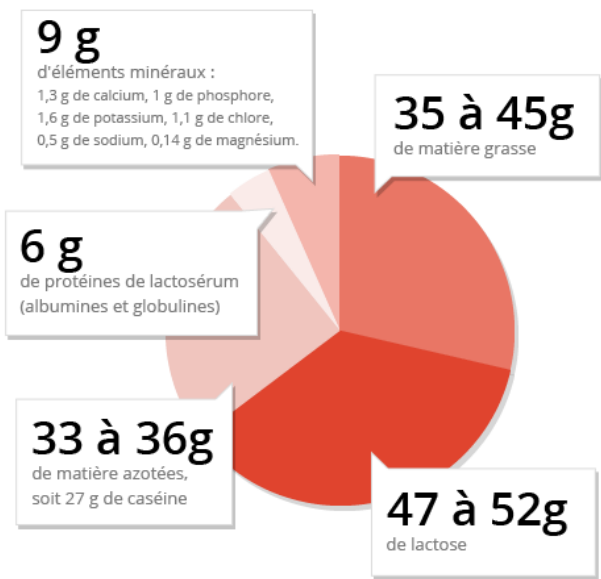


Figure 2. Composition moyenne du lait de vache (<http://www.maison-du-lait.com/fr/laits-liquides>)

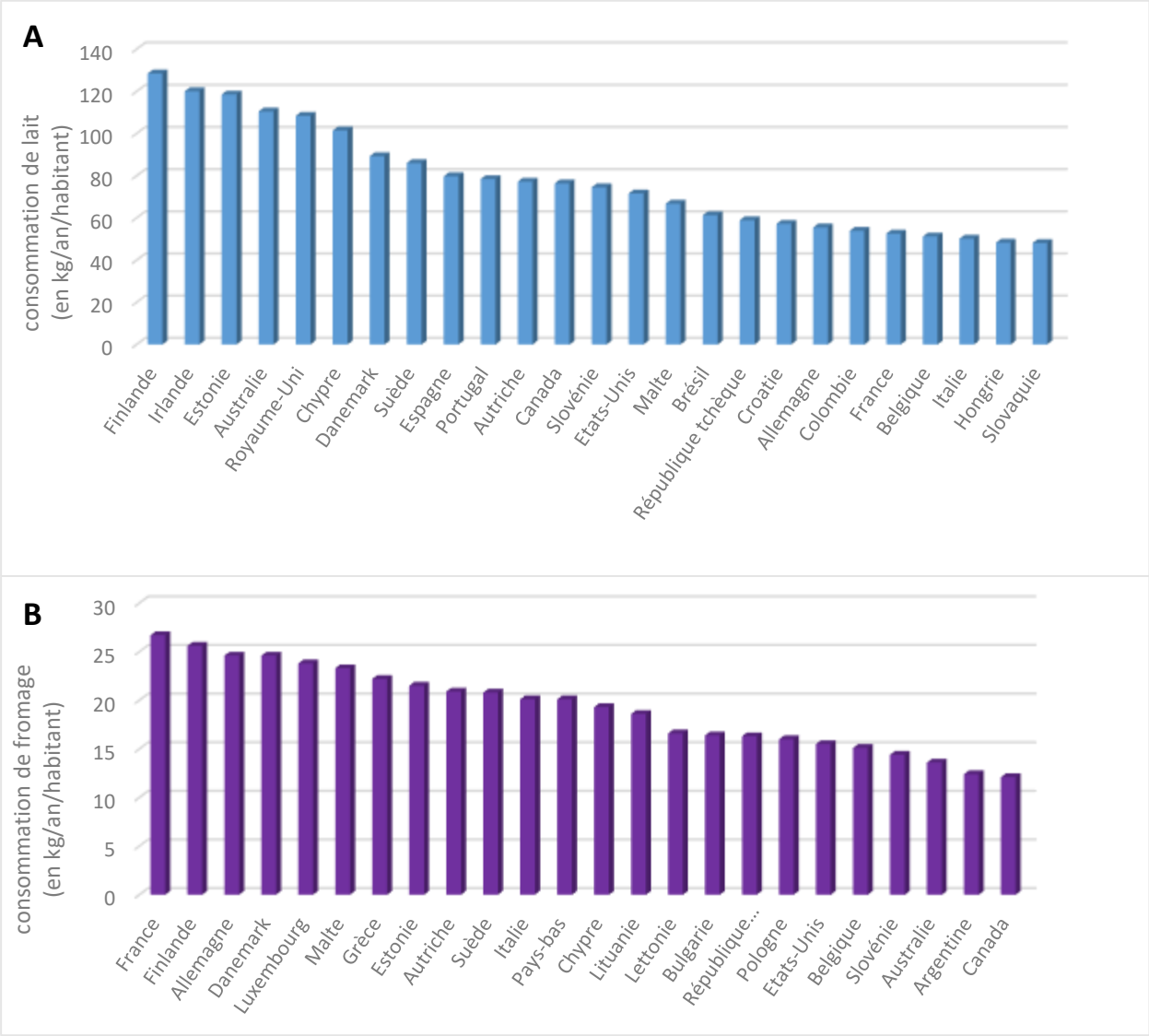


Figure 3. Consommation mondiale **A)** de lait liquide et **B)** de fromage en 2014, adapté du CNIEL 2016 (<http://www.maison-du-lait.com/fr/chiffres-cles/des-donnees-reference>)

1. Du lait aux fromages affinés : la construction des caractéristiques biochimiques et sensorielles

1.1. Composition du lait

Le lait est le produit de sécrétion des glandes mammaires des mammifères femelles à partir de la mise-bas (Vilain, 2010). Chez les vaches, la lactation entretenue par la tétée du veau ou la traite dure environ 10 mois. Au pic de lactation, la production de lait peut atteindre 40 à 50 litres par jour. Le lait est majoritairement composé d'eau, puis de lactose, de matière grasse, de matière protéique et de minéraux qui constituent les macronutriments (**Figure 2**). Les composés mineurs ou microconstituants sont principalement des oligoéléments, des vitamines, des pigments et des cellules somatiques. La présence de nutriments dans le lait et son pH proche de la neutralité en font un environnement favorable à la croissance de nombreux microorganismes dont la composition et le rôle seront abordés dans le chapitre 2.

Le lait et les produits laitiers dérivés (crème, beurre, yaourt, fromage) ont une place privilégiée dans notre alimentation de par leur importance quantitative et du fait qu'ils apportent des composés d'intérêt nutritionnel. Les français sont très régulièrement les premiers consommateurs mondiaux de beurre et de fromages (respectivement, 8,3 et 26,7 kg/an/habitant) et se classent en revanche plus loin concernant la consommation de lait liquide (21^e rang en 2014) (**Figure 3**). Les matières protéiques sont hautement digestibles et leur composition en acides aminés indispensables est en adéquation avec les besoins de l'Homme. Les matières grasses laitières constituent une des principales sources d'acides gras dans l'alimentation humaine. Elles sont composées en moyenne de 70% d'acides gras saturés (AGS), 26% d'acide gras monoinsaturés (AGMI) et de 4% d'acides gras polyinsaturés (AGPI) (**Figure 4**). Cette forte proportion en AGS est souvent associée à une image négative en raison de la présence des acides laurique (C12:0), myristique (C14:0) et palmitique (C16:0) qui sont considérés comme des agents athérogènes et hypercholestérolémiants lorsqu'ils sont consommés en excès tandis que les acides caproïque (C6:0), caprylique (C8:0), caprique (C10:0) et stéarique (C18:0) sont considérés comme neutres (Grundy and Denke, 1990). Les AGMI de configuration *cis* (notamment l'acide oléique (C18:1*cis*9)) sont supposés bénéfiques pour la santé humaine (Sibra et al., 2014). Les AGPI de la série oméga 3 (principalement l'acide linoléique (C18:3*n*-3)) et oméga 6 (principalement l'acide linoléique (C18:2*n*-6)) sont dits essentiels puisque l'Homme ne peut pas les synthétiser. Les recommandations actuelles visent à augmenter les apports en oméga 3 et à réduire ceux en oméga 6. Le lait contient également des AGPI de forme *trans* dont le rôle sur la santé est controversé selon leur origine, végétale ou animale. Dans cette famille d'acides gras *trans*, les acides linoléiques conjugués (**CLA pour conjugated linoleic acid**) produits lors de la biohydrogénation des AGPI dans le rumen, en

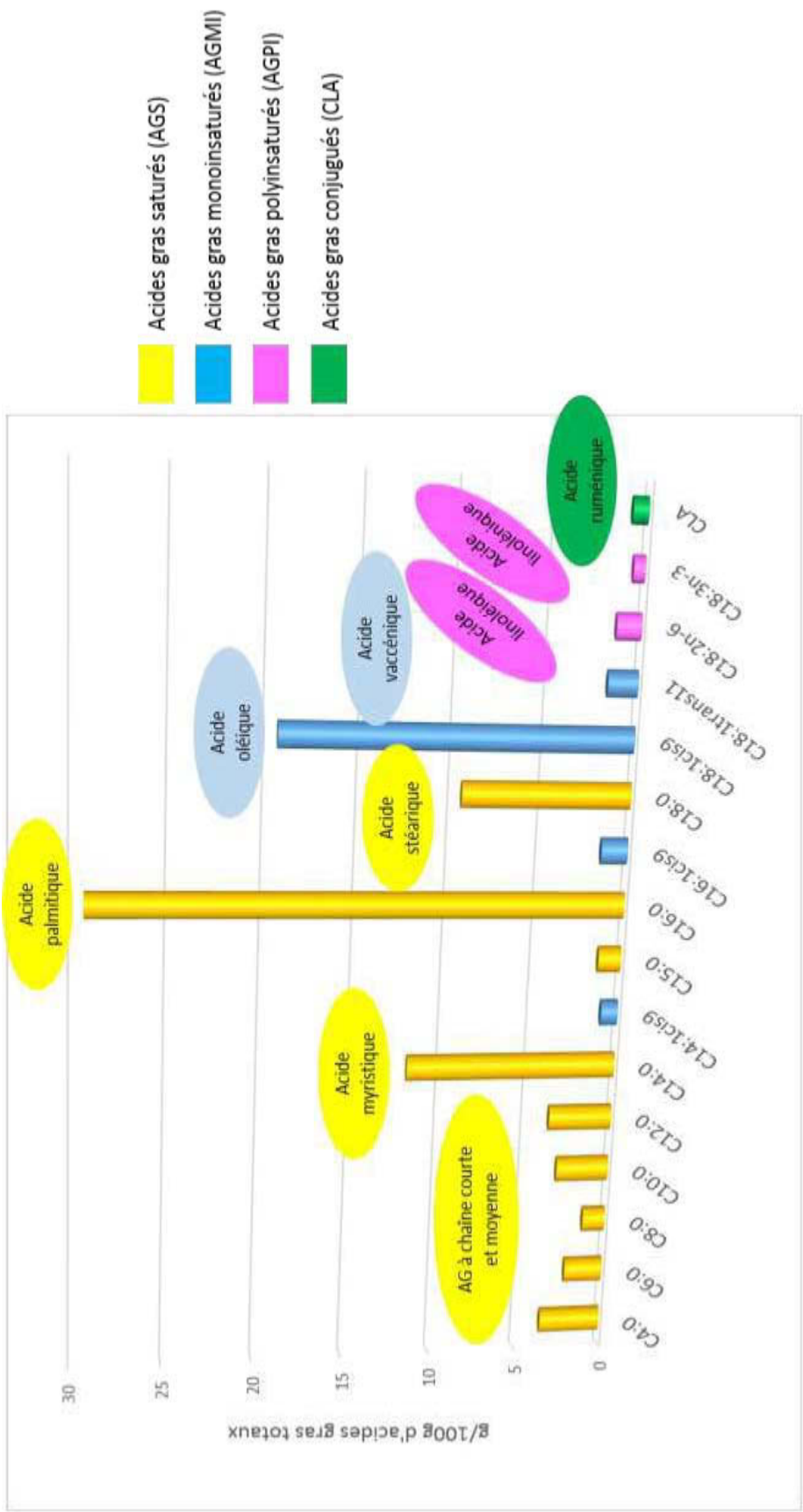


Figure 4. Distribution des principaux acides gras de la matière grasse du lait de vache adapté de Martin et al. (2014)

particulier l'acide ruménique (C18:2*cis9trans11*) dont l'acide vaccénique (C18:1*trans11*) est le principal précurseur, semble avoir des effets positifs sur notre santé. Compte tenu de la place des produits laitiers dans notre alimentation, moduler la composition de la matière grasse laitière est un réel enjeu pour la santé des consommateurs. Les facteurs susceptibles d'influencer la composition du lait, et notamment la matière grasse laitière, ont été largement étudiés dans la bibliographie. Je présenterai une synthèse non exhaustive de l'effet de ces facteurs, principalement ceux liés aux caractéristiques de l'animal et à son alimentation.

1.1.1. Influence de l'alimentation des animaux

L'alimentation des vaches est le facteur majeur de variation de la composition de la matière grasse du lait. Ces variations ont l'avantage d'être rapidement observées et réversibles. De nombreuses études ont montré que la mise à l'herbe des vaches laitières au printemps entraînait une réduction de la proportion en AGS, notamment du C16:0, et une augmentation de la proportion des acides gras insaturés (AGI) (principalement C18:1*cis-9* et C18:2*cis9trans11*) et de l'acide stéarique (C18:0) dans le lait comparé au lait des vaches nourries à base d'ensilage de maïs en période hivernale (Chilliard et al., 2007; Couvreur et al., 2006; Dewhurst et al., 2006; Ferlay et al., 2006; Lopez et al., 2014). Cet effet positif du pâturage est d'autant plus prononcé que l'herbe pâturée est à un stade précoce de développement (stade végétatif). A ce stade, les vaches produisent un lait riche en C18:0, C18:1*cis-9*, C18:1*trans11*, C18:3*n-3* et C18:2*cis9trans11* et moins riche en C16:0 et C18:2*n-6* (Chilliard et al., 2007; Coppa et al., 2015; Dewhurst et al., 2006; Ferlay et al., 2006). L'effet de la composition botanique des prairies sur le profil en acides gras du lait est moins important que celui du stade de maturité de l'herbe (Tornambé et al., 2007). L'altitude du pâturage a aussi un effet sur le profil en acides gras du lait qui se confond avec celui de la diversité botanique dans la mesure où les prairies permanentes avec des flores diverses sont plus fréquentes en montagne qu'en plaine. En effet, les laits de montagne sont plus riches en AGPI, C18:1*cis-9* et C18:2*cis9trans11*, et moins riches en AGS à courte et moyenne chaîne (C4:0 à C16:0) que les laits de plaine (Bugaud et al., 2001a; Collomb et al., 2002). Ces auteurs suggèrent que l'abondance de plantes dicotylédones riches en métabolites secondaires (terpènes, tanins et composés phénoliques) dans les prairies diversifiées de montagne pourrait inhiber la biohydrogénation ruminale des AGPI de l'herbe et donc favoriser leur transfert dans le lait. Ceci explique la teneur plus élevée en AGPI et C18:3*n-3* des laits de montagne (Chilliard et al., 2007).

Les vaches laitières reçoivent en complément des fourrages des aliments concentrés dont la proportion dans la ration et la nature sont très variables. De façon générale, l'addition de concentrés augmente la proportion d'AGS, et notamment d'acides gras à chaîne courte, et diminue celle des AGI, des acides gras à longue chaîne, du C18:1*trans11* et du C18:2*cis9trans11* (Bargo et al., 2006). Le profil

en acides gras est modulable selon la proportion de concentré ajoutée à la ration (Chilliard et al., 2007). La supplémentation des rations avec des oléagineux (colza, lin) peut améliorer la qualité nutritionnelle du lait en augmentant la proportion d'acides gras d'intérêt (C18:1*cis*-9 et C18:3*n*-3) et en diminuant celle des AGS à courte et moyenne chaîne (Glasser et al., 2008).

La composition de l'alimentation des animaux représente ainsi pour les éleveurs le moyen d'action le plus efficace pour moduler à court terme la composition de la matière grasse du lait.

1.1.2. Caractéristiques de l'animal

L'effet de la race sur la composition en acides gras du lait est limité (Ferlay et al., 2010; Hurtaud et al., 2009; Palmquist et al., 1993). Sur le terrain, il est souvent confondu avec les effets de l'alimentation et du mode de conduite associés à chaque race. Le stade et le rang de lactation sont aussi des facteurs de variation de la composition du lait en matière grasse. En début de lactation, les animaux sont en déficit énergétique ce qui entraîne une mobilisation des réserves corporelles adipeuses, constituées principalement d'acides gras à longue chaîne (C18:0 et C18:1*cis*9) (Kay et al., 2005; Palmquist et al., 1993). La teneur en C18:2*cis*9*trans*11 semble peu affectée par le stade de lactation des animaux (Kelsey et al., 2003).

La grande diversité des acides gras (400 identifiés à ce jour) qui composent la matière grasse laitière est à relier à la complexité du métabolisme des lipides au niveau du rumen et de la glande mammaire des vaches laitières. Cette dernière synthétise *de novo* environ 40% des acides gras du C4:0 au C16:0 (dont 50% du C16:0) sécrétés dans le lait et 60% des acides gras à longue chaîne sont issus du prélèvement des lipides dans le plasma sanguin (Chilliard et al., 2007; Ferlay et al., 2013).

1.2. Elaboration des caractéristiques sensorielles des fromages

1.2.1. Texture des fromages

Les effets du type d'alimentation des vaches laitières sur la texture des fromages sont bien documentés, et sont principalement liés à la composition en acides gras du lait (Martin et al., 2005). Comparé à l'ensilage de maïs, le pâturage est à l'origine de fromages moins fermes (Hurtaud et al., 2002) en raison du rapport C18:1*cis*9/C16:0 plus élevé dans les laits et les fromages issus d'une alimentation à base d'herbe pâturée. Les acides gras C16:0 et C18:1*cis*9 sont respectivement les AGS et AGI majoritaires de la matière grasse laitière. Le faible point de fusion des AGI produit une matière grasse fluide, et par conséquent des fromages plus crémeux (Bugaud et al., 2001a; Hurtaud et al., 2009; Martin et al., 2005). Les fromages de montagne provenant de laits issus du pâturage de prairies plus

diversifiées, sont moins élastiques et cohésifs que les fromages de vallée (Bugaud et al., 2001b). Ces différences sont attribuées à l'activité deux fois plus élevée de la plasmine (protéase endogène provenant du sang) impliquée dans la protéolyse primaire, et à la proportion plus élevée des AGI à longue chaîne dans les laits de montagne. Cependant, Coppa et al. (2011b) ont observé que la diversité botanique avait peu d'effet sur la texture des fromages de type Cantal. Ils ont constaté que la teneur en matière sèche, la minéralisation et la protéolyse, facteurs influant sur la texture des fromages (Fox et al., 2004) étaient similaires et les différences de leur profil en acides gras de faible amplitude. Les effets de l'addition de concentrés dans l'alimentation des vaches sur le profil en acides gras ont été largement étudiés (cf. 1.1.1) mais leurs effets sur les caractéristiques sensorielles des fromages ont été peu traités. Lerch et al. (2015) ont observé que des fromages de type Saint-Nectaire issus des régimes enrichis en graines de lin extrudées étaient plus fondants que les fromages témoins en raison de leur teneur élevée en AGI. Michalski et al. (2003) ont montré que la taille des globules gras a aussi un effet sur la texture. Les Camembert à petits globules gras sont moins fermes, plus coulants et plus élastiques que ceux à gros globules gras. L'alimentation des vaches contribue à modifier la taille des globules gras (Couvreur et al., 2007). Ceux-ci sont plus petits dans le lait de vaches avec une alimentation à base d'herbe en comparaison à une alimentation à base d'ensilage de maïs.

1.2.2. Apparence des fromages

L'effet très fort du pâturage sur la coloration jaune de la pâte des fromages est majoritairement dû aux pigments caroténoïdes (dont le β -carotène) présents dans les feuilles des végétaux (Martin et al., 2005; Nozière et al., 2006). Le β -carotène ingéré est absorbé au niveau intestinal et transporté par voie sanguine jusqu'à la glande mammaire où il est sécrété dans le lait. L'herbe fraîche à un stade feuillu est particulièrement riche en caroténoïdes contrairement à l'ensilage de maïs. Les caroténoïdes étant partiellement oxydés lors du séchage de l'herbe, le foin est pauvre en caroténoïdes et l'ensilage d'herbe a des teneurs intermédiaires, variables en fonction de la durée de séchage. Ainsi, les fromages fabriqués avec des laits d'hiver où les vaches sont nourries avec de l'ensilage de maïs ou du foin sont plus blancs. Au pâturage, la couleur jaune des fromages diminue lorsque le stade de maturité de l'herbe est avancé (Coppa et al., 2011a) et lorsque les prairies sont très diversifiées (Lucas et al., 2006a).

L'apparence de la croûte des fromages dépend essentiellement de la composition microbiologique, et notamment des microorganismes volontairement inoculés (ferment). Leur croissance sur la croûte dépend du microbiote du lait, du pH de la croûte et des conditions d'affinage incluant l'ambiance de la cave, les soins apportés aux fromages et la durée d'affinage. Coppa et al. (2011a) et Lerch et al. (2015) ont également émis l'hypothèse que la composition en acides gras totaux

(saturés *versus* insaturés) de la croûte des fromages pouvait créer un environnement plus ou moins favorable à la croissance de certains microorganismes.

1.2.3. Flaveur des fromages

Le lien entre le régime alimentaire des vaches laitières et la flaveur des fromages est difficile à interpréter. Plusieurs auteurs ont mis en évidence un lien entre la diversité botanique des prairies et la flaveur plus diversifiée des fromages au lait cru (Martin et al., 2005; Monnet et al., 2000). Les terpènes issus directement de l'ingestion de certaines plantes aromatiques sont en concentration trop faible dans les fromages pour jouer un rôle direct sur la flaveur mais ils sont en mesure de limiter les activités microbiennes en raison de leurs propriétés antimicrobiennes (Buchin et al., 1999; Tornambé et al., 2008). L'augmentation de l'activité de la plasmine, en particulier dans les fromages à pâte pressée cuite pourrait être due à l'ingestion de plantes particulières comme les renoncules (Buchin et al., 1999; Bugaud et al., 2001a). Les AGI peuvent être dégradés par les enzymes microbiennes dans le rumen et produire des précurseurs aux composés responsables de l'arôme des fromages (Martin et al., 2005; Urbach, 1990).

La plupart des études porte sur l'effet propre d'un seul facteur mais peu d'études s'intéressent à l'effet du système d'élevage sur les caractéristiques sensorielles des fromages qui résulte de la combinaison de plusieurs facteurs. En comparant un système d'élevage intensif à un système extensif, Giaccone et al. (2016) ont constaté que les fromages au lait cru issus du système extensif étaient caractérisés par une flaveur et une odeur intenses en été alors qu'il n'y avait pas de différence entre ces deux systèmes en hiver puisque les vaches des deux systèmes étaient nourries avec de l'ensilage de maïs et des concentrés.

Les travaux rapportés ci-dessus concernent exclusivement les fromages au lait cru. Or Verdier-Metz et al. (2002) ont constaté que le régime alimentaire n'avait pas d'effet significatif sur la flaveur des fromages de type Cantal au lait pasteurisé, contrairement aux fromages au lait cru. Les activités du microbiote du lait contribuent aux principales modifications biochimiques survenant au cours de l'affinage, conduisant au développement de la flaveur des fromages (Fox et al., 2000; Grappin et Beuvier, 1997; Hurtaud et al., 2001). Les traitements thermiques comme la pasteurisation réduisent la charge et la diversité microbienne des laits ce qui entraîne une diminution de la lipolyse et de la protéolyse. Buchin et al. (1998) ont constaté une concentration élevée de composés volatils à fort potentiel aromatique tels que les alcools, les acides gras volatils (AGV) et les composés soufrés dans les fromages au lait cru, avec comme conséquence un arôme plus fort. L'effet de la durée d'affinage et de la technologie fromagère sur la flaveur des fromages est bien documenté. Les paramètres technologiques ont une influence plus importante sur la flaveur des fromages que le système d'élevage

(Agabriel et al., 2004; Cornu et al., 2009; Hurtaud et al., 2009; Verdier-Metz et al., 2009). **Pourtant**, l'effet de l'alimentation des vaches sur la composition et les activités du microbiote du lait, puis du fromage est peu étudié.

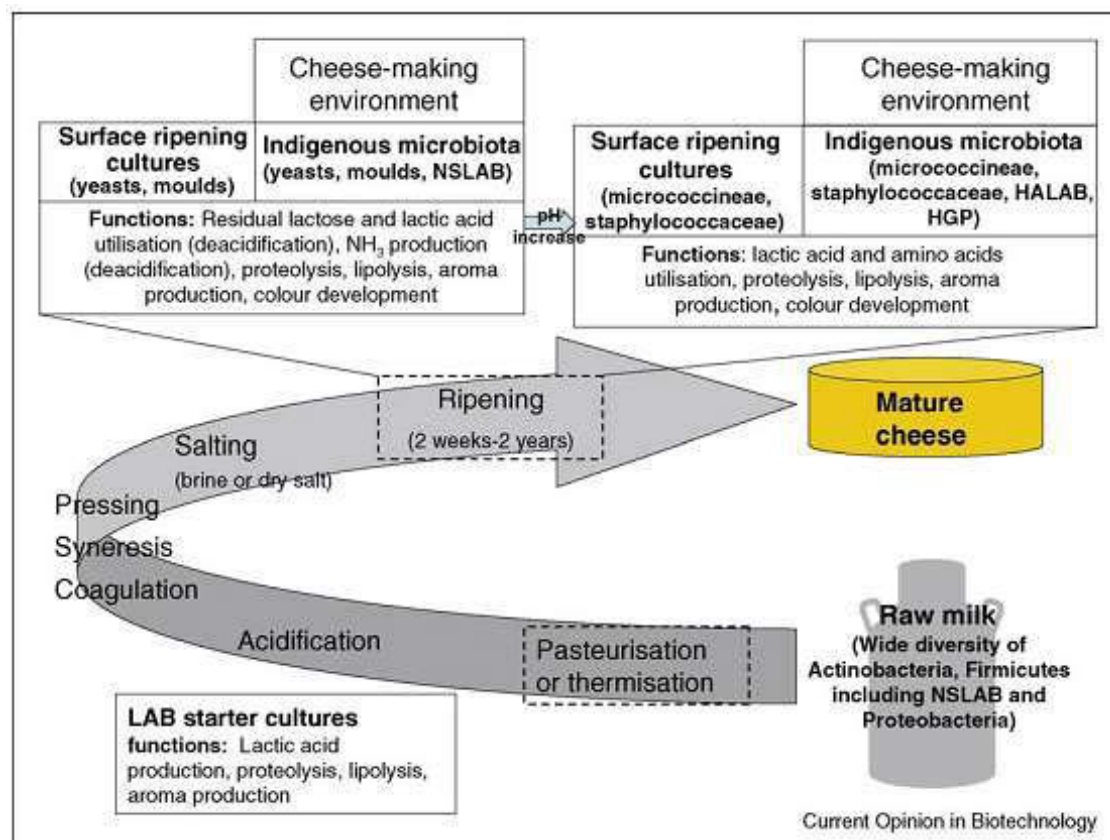


Figure 5. Vue globale de la succession des principaux groupes microbiens et de leurs fonctions au cours de la fabrication des fromages (Irlinger and Mounier, 2009).

LAB: lactic acid bacteria; NSLAB: non-starter LAB; HALAB: halophilic and alkaliphilic LAB; HGP: moderately halophilic Gammaproteobacteria ; $\square\square\square$ non-obligatory processing steps

2. Composition, origine et diversité de la communauté microbienne des laits et des fromages

Les fromages traditionnels constituent des écosystèmes microbiens complexes, composés de microorganismes autochtones et de ferments. Ce microbiote dont la structure de la communauté implique une succession de différents groupes microbiens, joue un rôle central dans la fabrication des fromages (**Figure 5**). Le développement des caractéristiques sensorielles des fromages est largement déterminé par la composition et l'évolution de ce microbiote à travers ces activités enzymatiques qui seront présentées dans le chapitre 3. La composition microbienne des fromages dépend du microbiote du lait cru et de la communauté microbienne de l'environnement présente tout au long du processus de fabrication des fromages, en particulier pour la croûte des fromages. Au total, plus de 100 genres et 400 espèces ont été détectés dans le lait cru (Montel et al., 2014). Ce dernier peut être fortement influencé par les pratiques d'élevage qui seront abordées dans ce chapitre. Pour approfondir les connaissances sur la composition taxonomique et les potentialités fonctionnelles des communautés microbiennes de l'environnement de la ferme aux fromages affinés, il est possible de s'appuyer sur les nouvelles techniques de séquençage à haut-débit (métagénomique, métatranscriptomique, métaprotéomique, ...) qui seront aussi détaillées dans ce chapitre.

2.1. Les grands groupes microbiens et leurs principales fonctions

2.1.1. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (LAB) ne correspondent pas forcément au groupe microbien dominant dans les laits mais elles ont un intérêt technologique majeur. Ce groupe est composé majoritairement des 7 genres suivants : *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*, tous affiliés taxonomiquement au phylum des Firmicutes (Franciosi et al., 2009; Quigley et al., 2013). Le rôle initial des LAB est de dégrader le lactose (sucre majoritaire du lait) en acide lactique. La production d'acide lactique conduit à un abaissement du pH qui contribue à la coagulation des protéines du lait. Du fait de cette capacité, certaines LAB telles que *Lactococcus lactis*, et en particulier *Lactococcus lactis* spp. *lactis* et *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* sont souvent utilisées comme ferment d'acidification. Elles sont souvent associées avec d'autres LAB mésophiles (*Leuconostoc mesenteroides* et *Leuconostoc pseudomesenteroides*) ou thermophiles (*Streptococcus thermophilus*).

Au cours de l'affinage des fromages, les LAB contribuent également au développement de la flaveur et de la texture des fromages (Hickey et al., 2015; Smit et al., 2005). A la surface des fromages, les LAB acidophiles (*Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*) et halophiles

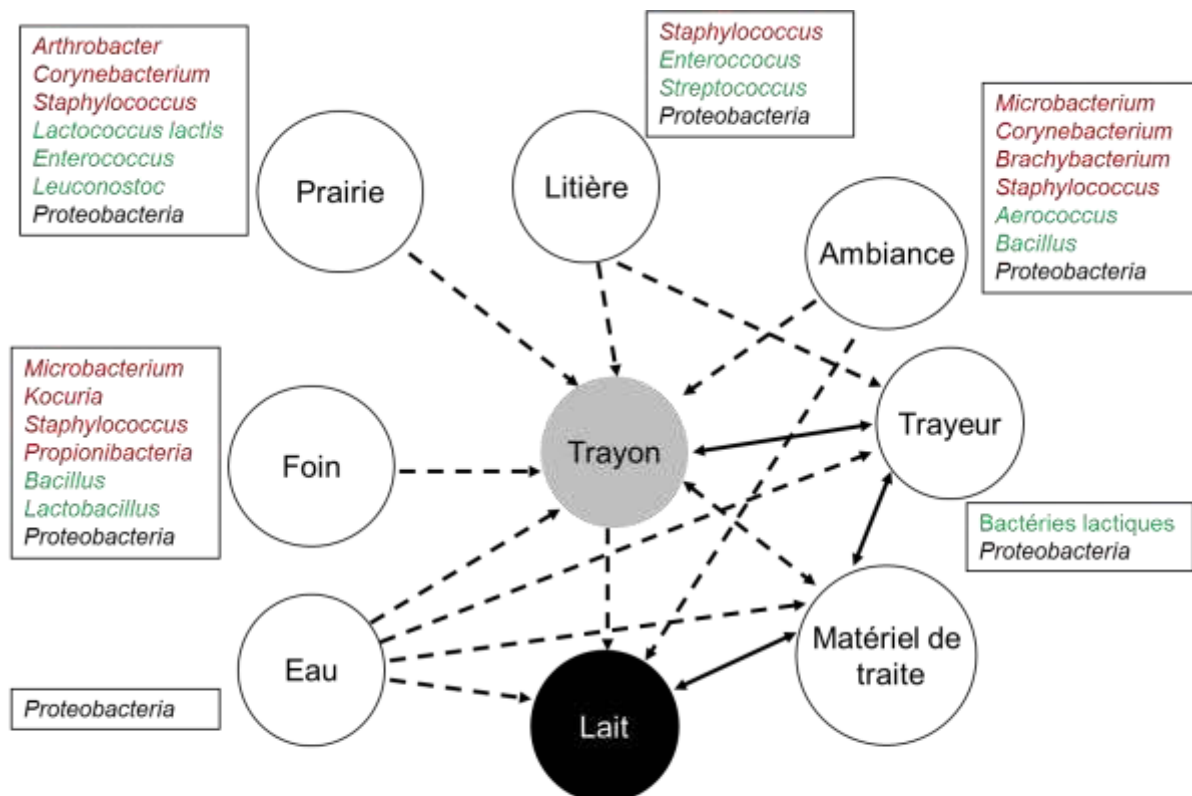
(*Marinilactibacillus* et *Facklamia*) sont sous-dominantes (Delbès et al., 2015). Au cœur des fromages, les LAB sont le groupe microbien dominant composé principalement de *Lc. lactis*, *S. thermophilus*, *Ln. mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* (Montel et al., 2014). La diversité des LAB peut augmenter au cours du temps dans la pâte selon les variétés de fromages puisque ces dernières sont adaptées aux conditions physico-chimiques de la pâte (pH faible, teneur en NaCl élevée, anaérobiose, manque de glucides fermentescibles, etc.).

2.1.2. Les levures et moisissures

Les levures et les moisissures colonisent la surface des fromages à partir des premiers jours d'affinage. Les genres les plus fréquemment détectés parmi les levures sont *Debaryomyces*, *Yarrowia*, *Candida*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces* et *Pichia*, et parmi les moisissures *Penicillium*, *Scopulariopsis* et *Fusarium* (Irlinger et al., 2015). Leur rôle principal consiste à neutraliser le pH à la surface des fromages en métabolisant l'acide lactique et en produisant de l'ammoniac, pour ensuite, permettre la croissance des bactéries aérobies acido-sensibles et halotolérantes (Fleet, 1990). Les levures, très tolérantes au sel et/ou acidophiles, telles que *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces lactis* et *Kluyveromyces marxianus*, peuvent être associées à des espèces fongiques filamenteuses comme *Penicillium camemberti* ou *Penicillium roqueforti* pour être ensemencées de façon dirigée. De plus, les levures et les moisissures participent au développement de la flaveur à l'issue d'une intense protéolyse et lipolyse à la surface des fromages. Les levures sont un groupe sous-dominant au cœur des fromages même si on retrouve une grande diversité d'espèces de levures dans la plupart des fromages à pâte non cuite (Callon et al., 2006; Montel et al., 2014).

2.1.3. La communauté bactérienne de surface

A la surface des fromages, en interaction avec les levures et les moisissures, plusieurs groupes bactériens se succèdent dans le temps. Dans les premiers jours d'affinage, les bactéries à Gram négatif affiliées au phylum des Proteobacteria sont dominantes dans les fromages à croûte naturelle, puis leur succèdent très rapidement *Staphylococcus* affilié aux Firmicutes, et au cours de l'affinage, *Brevibacterium* et *Brachybacterium* appartenant au phylum des Actinobacteria émergent (Wolfe et al., 2014). Parmi les Actinobacteria, les genres *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Agrococcus* et *Micrococcus* sont aussi fréquemment identifiés à la surface des fromages (Irlinger et al., 2015). Les bactéries de surface, et en particulier *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium aurantiacum*, *Brachybacterium alimentarium*, *Arthrobacter arilaitensis*, *Corynebacterium casei*, *Corynebacterium variabile* et *Microbacterium gubbeenense* qui sont couramment utilisés comme ferment d'affinage,



Les mêmes espèces présentes dans des environnements différents ne sont pas forcément des souches identiques.

Figure 6. Principales sources de micro-organismes du lait (Verdier-Metz et al., 2012b)
En marron : *Actinobacteria*; en vert : *Firmicutes*; en noir : *Proteobacteria*

jouent un rôle majeur dans l'affinage des fromages par leurs activités protéolytique et lipolytique qui conduisent à la formation de composés aromatiques, et elles sont à l'origine de la coloration de la croûte des fromages (Irlinger and Mounier, 2009).

2.2. Les sources de microorganismes du lait et du fromage

Dans les cellules de la glande mammaire de vaches saines, le lait synthétisé est considéré comme stérile (Tolle, 1980). Dans une étude récente, Falentin et al. (2016) suggèrent que le microbiote associé à l'épithélium du canal et de la citerne des trayons constitue une barrière microbiologique envers les pathogènes (mammite). Les études antérieures se sont focalisées sur les sources potentielles de l'environnement de la ferme pour comprendre l'origine des microorganismes dans le lait cru (Montel et al., 2012; Quigley et al., 2013; Vacheyrou et al., 2011; Verdier-Metz et al., 2012a). Parmi les 141 espèces bactériennes isolées à partir des différents compartiments de l'étable (air, foin, poussière, peau des trayons, lait), 48 espèces bactériennes ont été retrouvées à la fois dans le lait et dans l'environnement de l'étable (Vacheyrou et al., 2011). Dans cette étude, 19 espèces bactériennes telles que *Acinetobacter lwoffii*, *Enterococcus* sp., *Escherichia coli*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Microbacterium lacticum*, *Microbacterium oxydans* et *Paracoccus* sp. ont été détectées uniquement dans le lait cru. A ce jour, les sources d'ensemencement naturelles du lait cru sont partiellement décrites (**Figure 6**). En effet, les études se focalisent essentiellement sur les microorganismes pathogènes ou se limitent généralement au niveau d'un seul groupe microbien à cause des méthodes d'analyse disponibles. Toutefois, la peau des trayons est souvent considérée comme le principal réservoir du microbiote dominant des laits crus (Michel et al., 2006). Verdier-Metz et al. (2012a) ont souligné la grande diversité bactérienne à la surface des trayons et ont montré qu'une majorité des bactéries appartient au phylum des Firmicutes. Des bactéries d'intérêt technologique appartenant aux genres *Enterococcus* et *Leuconostoc* ainsi que des bactéries pouvant contribuer au développement des caractéristiques sensorielles des fromages et appartenant aux genres *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* et *Staphylococcus* ont été identifiées à la fois sur la peau des trayons et dans les laits crus. Dans cette étude, les auteurs ont montré que la composition de la communauté microbienne à la surface des trayons varie quantitativement et qualitativement d'une ferme à l'autre, toutefois les variations inter-individuelles au sein d'une même ferme n'ont pas été étudiées. Ces différences peuvent être attribuées à différents facteurs. L'équilibre microbien sur la peau des trayons peut être influencé par le logement des animaux (extérieur ou intérieur), leur alimentation (pâturage, foin, ensilage de maïs) et par conséquent la saison (Verdier-Metz et al., 2015). En effet, les niveaux des groupes microbiens sur la peau des trayons des vaches laitières conduites au pâturage sont plus faibles que ceux des vaches confinées au bâtiment tandis que la diversité microbienne de la peau des trayons

des animaux au pâturage est supérieure à celle des animaux maintenus à l'intérieur (Verdier-Metz et al., 2012b). Par exemple, les prairies peuvent abriter des niveaux élevés d'entérobactéries, de staphylocoques, de bactéries corynéformes et de levures (Denis et al., 2004; Hagi et al., 2010) alors que l'ensilage peut héberger des bactéries lactiques, des coliformes, des levures et des moisissures (Montel et al., 2014). Lorsque les vaches sont couchées, la litière en contact avec la surface des trayons peut être une source directe de microorganismes (Zdanowicz et al., 2004) tandis que les matières fécales peuvent être des sources indirectes d'entérobactéries, de bactéries d'altération (par exemple, des spores de bactéries butyriques), de levures, de bifidobactéries et de bactéries lactiques. La parité des vaches et leur état physiologique et sanitaire sont aussi des facteurs de variation de la communauté microbienne de la peau des trayons (Falentin et al., 2016 ; Monsallier et al., 2012). Les pratiques d'hygiène de traite comme le pré- et post-trempe des trayons constituent les principaux leviers pouvant modifier la diversité du microbiote des trayons, et plus particulièrement influencer sur la présence ou non dans les laits crus de plusieurs espèces d'intérêt technologique appartenant aux genres *Staphylococcus* et *Corynebacterium* (Mallet et al., 2012; Monsallier et al., 2012; Verdier-Metz et al., 2014). Les trayons semblent jouer un rôle de vecteur de la population microbienne entre les environnements de la ferme et le lait. Cependant, certains genres bactériens (par exemple, *Aerosphaera*, *Arcanobacterium*, *Coprococcus* et *Solobacterium*) identifiés à la surface des trayons ne sont pas retrouvés dans le lait cru.

Le niveau des groupes microbiens et la composition microbienne du lait cru dépendent également des installations et des pratiques de traite de la ferme. La salle de traite et la stabulation sont des sources importantes de microorganismes par l'eau de rinçage et les aérosols ainsi que les biofilms à la surface des équipements de traite (machine à traire, lactoduc et tank) (Gelsomino et al., 2002; Kagkli et al., 2007; Leriche and Fayolle, 2012; Marchand et al., 2012). Les normes strictes d'hygiène au niveau des pratiques de traite ont entraîné une réduction de la charge microbienne des laits crus, voire une réduction des populations d'intérêt technologique (Quigley et al., 2013). Le lait de ferme réfrigéré et conservé à 4°C jusqu'à sa transformation ou sa collecte a une composition microbienne différente du lait de cuve qui a été transporté et transféré dans les cuves d'une fromagerie. Le premier est dominé par des bactéries à Gram positif (*Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Kocuria*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Enterococcus*) tandis que le lait de cuve est dominé par les bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Achromobacter*, *Halomonas* et *Psychrobacter*) (Fricker et al., 2011 ; Irlinger et al., 2015). Ces bactéries psychrotrophes sont capables de survivre à de basses températures (4°C) dans le lait cru avant la fabrication du fromage (Raats et al., 2011). Au final, la diversité microbienne au sein des laits crus varie d'une exploitation à l'autre et en fonction des saisons. Elle dépend fortement de l'ensemble des

pratiques de gestion de chaque exploitation, qui peuvent donc affecter les qualités sensorielles et sanitaires des fromages au lait cru.

Au cours du procédé de fabrication fromagère, le microbiote du lait est enrichi par différentes sources. Certains équipements de la fromagerie et pratiques fromagères participent à l'enrichissement du microbiote des laits de cuve et des fromages. Certaines espèces bactériennes et fongiques intentionnellement ajoutées comme ferments d'acidification et d'affinage (cf. 2.1) sont susceptibles d'entrer en compétition avec les microorganismes autochtones du lait cru mais ne font pas forcément partie de la communauté dominante des fromages affinés (Cogan et al., 2014; Wolfe et al., 2014). Wolfe et al. (2014) ont reporté que 60% des genres bactériens et 25% des genres fongiques sur la croûte des fromages sont issus de sources environnementales. La surface en bois des cuves de fabrication utilisée pour la fabrication des fromages AOP Salers et AOP Ragusano sont un réservoir de microorganismes, et notamment de bactéries lactiques (Didienne et al., 2012 ; Licitra et al., 2007). Après leur passage dans ces cuves, la charge microbienne des laits pasteurisés avait augmenté. Par exemple, certaines espèces de *Leuconostoc* ont la capacité de survivre pendant une longue période sur du matériel de fromagerie et de résister au traitement thermique. De même, le biofilm présent sur les planches d'affinage en bois est une source potentielle de microorganismes qui peuvent être transférés directement à la surface du fromage (Mariani, 2007).

La connaissance de la diversité microbienne des produits laitiers et des transferts entre l'environnement de la ferme et les environnements de production ont d'abord été acquises par des méthodes de culture des microorganismes. L'essor récent des approches « -omiques » offre l'opportunité d'approfondir les connaissances sur la diversité taxonomique et fonctionnelle des microorganismes présents dans ces différents écosystèmes.

2.3. Stratégies d'étude des écosystèmes microbiens laitiers

2.3.1. Méthodes conventionnelles

L'approche classique pour caractériser les communautés microbiennes des laits et fromages repose sur l'isolement et la culture des microorganismes avant leur identification selon des critères morphologiques, biochimiques ou génétiques (Ercolini et al., 2001; Jany and Barbier, 2008). Il est par conséquent nécessaire de bien choisir les milieux de culture, la température d'incubation, le pH et l'atmosphère d'incubation (par exemple, la présence ou non d'oxygène dans le milieu de culture). La méthode culture-dépendante reste très utilisée dans le milieu industriel pour déterminer le nombre de bactéries totales reflétant la qualité microbiologique du lait ou pour détecter des pathogènes spécifiques car elle demande une faible technicité et est peu coûteuse (Quigley et al., 2011). Les limites

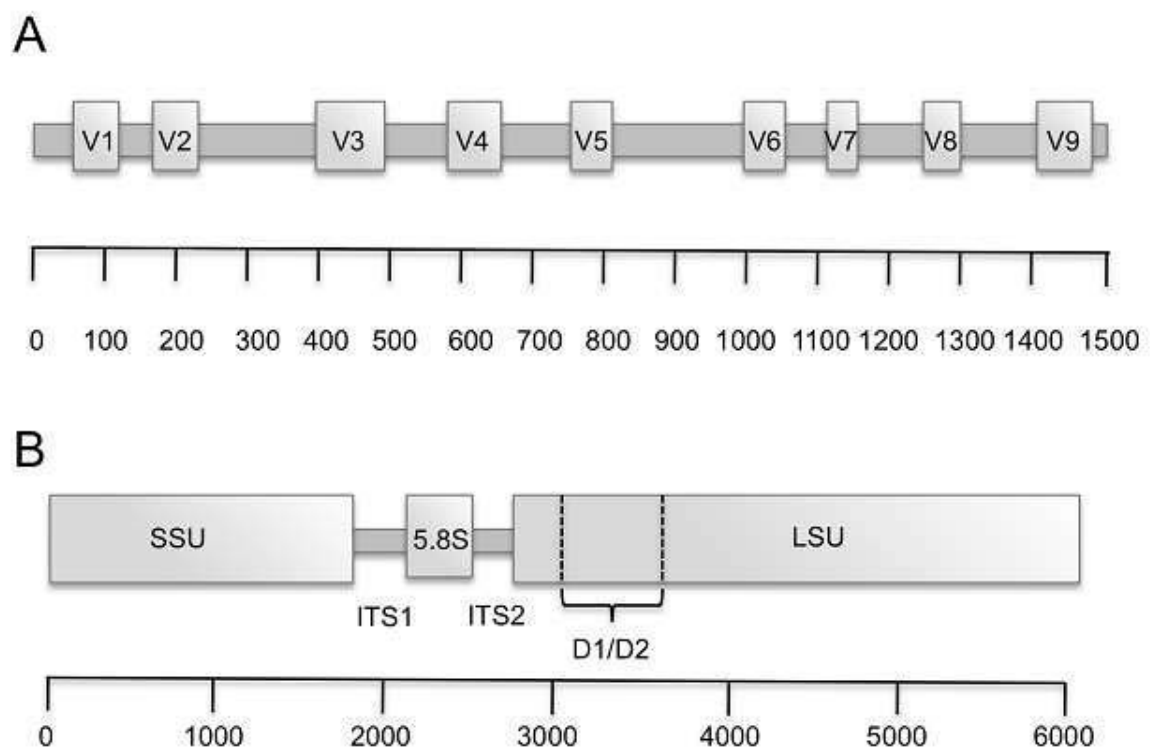


Figure 7. Structure des opérons ribosomaux **(A)** gène de l'ARNr 16S des procaryotes et **(B)** opéron ribosomal fongique (Bokulich and Mills, 2012). L'échelle est en paires de base (pb).

SSU: small subunit (ARNr 18S)

LSU: large subunit (ARNr 23S)

de la méthode culture-dépendante pour étudier des écosystèmes complexes sont désormais bien connues. Elle nécessite beaucoup de temps et de travail et conduit à une sous-estimation de la diversité de la communauté microbienne due à des microorganismes présents en forte abondance et/ou à l'inadéquation des conditions de culture choisies pour une grande majorité de microorganismes. Pour ces raisons, l'approche culture-indépendante basée sur l'ADN ou l'ARN est devenue incontournable pour caractériser l'ensemble de la diversité microbienne d'un écosystème malgré certains biais, discutés dans le paragraphe suivant.

2.3.2. Détermination de profils de diversité, indépendamment de la culture à l'aide de marqueurs phylogénétiques

En écologie microbienne, l'émergence de la biologie moléculaire a apporté une vision différente des écosystèmes microbiens. Ces méthodes moléculaires sont plus rapides et plus sensibles et ont l'avantage de permettre la détection des microorganismes difficiles à cultiver ou non cultivables (Quigley et al., 2011). L'efficacité de ces méthodes dépend de la concentration et de la pureté de l'ADN (ou ARN) extrait représentant la communauté microbienne totale mais il est évident que l'ADN de toutes les espèces présentes dans le même échantillon ne peut être extrait avec la même efficacité. L'identification des microorganismes repose ensuite sur l'amplification de marqueurs phylogénétiques, le plus souvent les gènes codant pour les ARN ribosomaux (ARNr) et les régions ITS (*Internal Transcribed Spacer*), dont la présence est universelle et la fonction est conservée dans tous les organismes (**Figure 7**). Les gènes codant pour les ARNr sont groupés sous forme d'opéron qui peut être présent en plusieurs copies dans le génome ce qui peut induire une surestimation de l'abondance des espèces détectées dans un écosystème (Cihlar et Sypherd, 1980; Fogel et al., 1999). Ces gènes ont un faible pouvoir résolutif pour des espèces bactériennes très proches. Pour les champignons (levures et moisissures), les régions ITS ont été adoptées comme « barcode » universel puisqu'elles offrent une meilleure discrimination que les gènes de l'ARNr (Anderson et Cairney, 2004). Les marqueurs phylogénétiques possèdent à la fois des régions hautement conservées et des régions hypervariables. La présence de régions conservées facilite l'hybridation d'amorces universelles ou de sondes tandis que les régions hypervariables (ex : ARNr 16S comprend 9 régions hypervariables) permettent l'identification des microorganismes (Justé et al., 2008). Les séquences amplifiées peuvent être ensuite séparées par des techniques d'empreinte moléculaire basée sur l'électrophorèse ou être clonées dans des vecteurs pour être séquencées. D'autres techniques permettant de quantifier ou de cibler certaines espèces, genres ou groupes microbiens nécessitent le développement d'amorces spécifiques (PCR quantitative) ou de sondes spécifiques pouvant s'hybrider directement à l'ADN (puces à ADN, FISH). Ces techniques sont résumées dans la **Figure 8**. Ces différentes approches ont été largement décrites et utilisées depuis une quinzaine d'années pour caractériser la diversité microbienne des laits

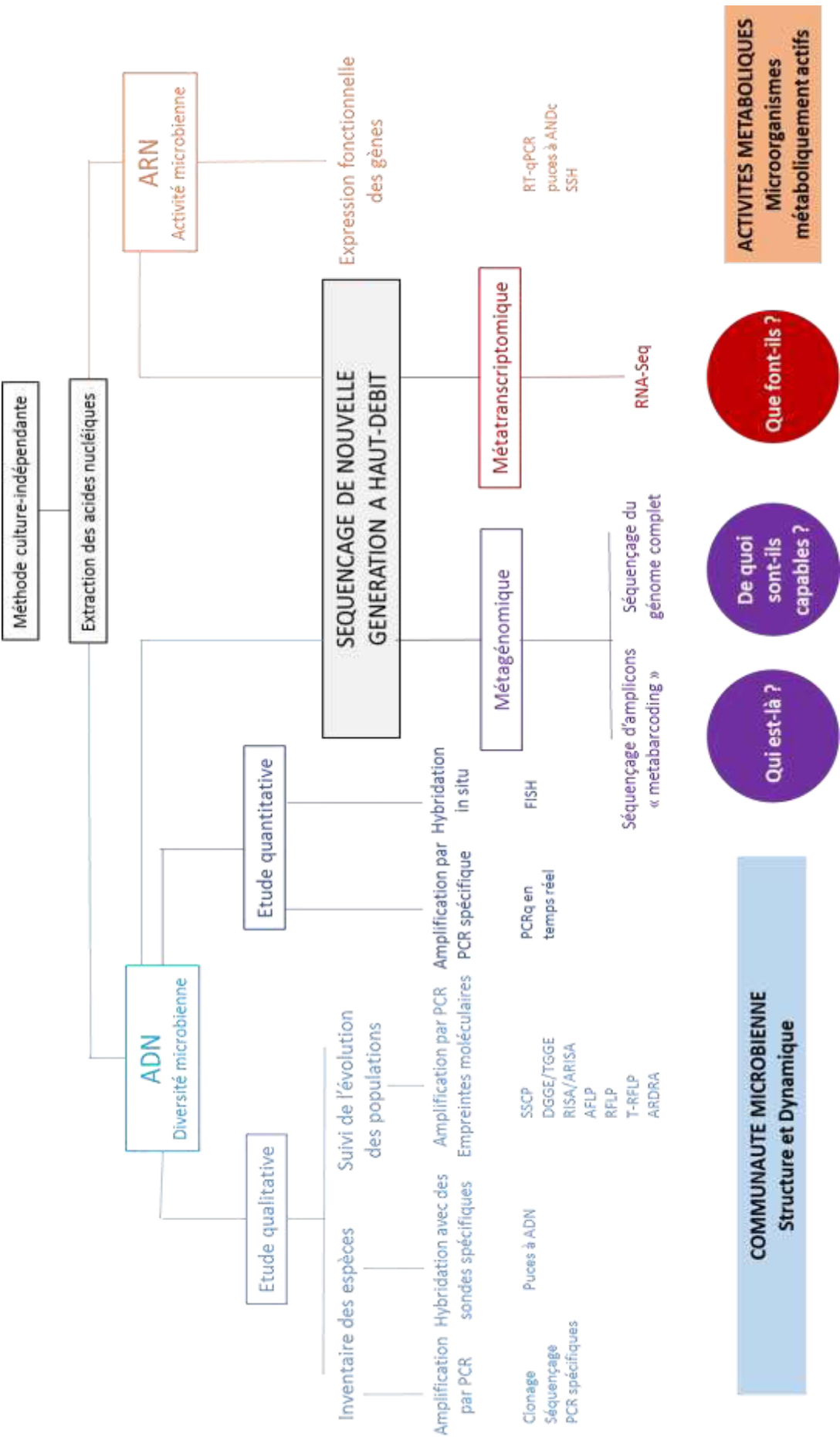


Figure 8. Méthodes culture-indépendantes pour étudier la diversité et les activités microbiennes adapté de Ndoye et al. (2011)

et des fromages (Jany and Barbier, 2008; Ndoye et al., 2011; Quigley et al., 2013), et plus rarement des environnements de ferme et de la surface des trayons (Braem et al., 2012; Gill et al., 2006; Vacheyrou et al., 2011; Verdier-Metz et al., 2012a). L'identification des espèces sous-dominantes reste le point faible de ces techniques (Bent et Forney, 2008). De plus, les études reposant sur l'extraction d'ADN ne permettent pas de distinguer les microorganismes viables ou non viables. Pour remédier à ce problème, des solutions de monoazide d'éthidium ou de monoazide de propidium peuvent être utilisées pour marquer l'ADN des cellules mortes et empêcher son amplification par PCR (Josefsen et al., 2010; Rudi et al., 2005). Toutefois, ces substances utilisées en trop forte concentration ($>50 \mu\text{g/mL}$) peuvent pénétrer dans les cellules bactériennes viables empêchant leur amplification (Kobayashi et al., 2009). Une autre alternative consiste à utiliser l'ARN pour cibler les microorganismes viables et actifs (Alessandria et al., 2010) mais il est également plus difficile à manipuler.

2.3.3. Apports du séquençage à haut débit à la connaissance des écosystèmes microbiens des laits, fromages et environnements de production

Ces dernières années, il y a eu une évolution spectaculaire dans le domaine de la microbiologie alimentaire grâce aux technologies de séquençage à haut débit (HTS, *High-Throughput Sequencing*) appelé aussi séquençage de nouvelle génération (NGS, *Next-Generation Sequencing*). Peu à peu, le séquençage est en train de devenir la technologie standard à appliquer pour répondre à de nombreuses questions et améliorer notre connaissance des communautés microbiennes au sein des différents écosystèmes (**Figure 8**). La question « Qui est présent ? » peut être résolue en utilisant diverses approches : traditionnellement, les techniques d'empreinte moléculaire ou la méthode de Sanger (séquençage de l'ADN d'une souche isolée) étaient utilisées ; aujourd'hui avec les techniques NGS, le séquençage massif des amplicons de marqueur phylogénétique d'une communauté microbienne est facilement réalisable. Pour répondre à la question « De quoi sont-ils capables ? », on pouvait utiliser le clonage ou les puces à ADN, et maintenant les techniques NGS offrent la possibilité de séquencer le génome entier des microorganismes dominants d'un écosystème. Enfin, la métatranscriptomique permet aussi de répondre à la question « Qui fait quoi ? » en s'appuyant sur les fonctions exprimées au niveau d'une communauté microbienne. Plusieurs technologies de séquençage de nouvelle génération ont été développées parmi lesquelles Roche 454, Illumina, ABI SOLiD et Ion Torrent. Le principe de ces différentes techniques ainsi que leurs avantages et inconvénients ont été largement décrits (Ansorge, 2009; Liu et al., 2012; Mardis, 2008; Pettersson et al., 2009). Je vais maintenant présenter une synthèse non exhaustive des résultats obtenus grâce aux NGS dans les trayons, les laits et les fromages. Ces résultats sont synthétisés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1. Synthèse des études de séquençage à haut débit sur les communautés microbiennes des trayons, des laits et des fromages, en incluant les principaux paramètres techniques et les découvertes majeures

Produits laitiers (origine du lait ¹)	Variété de fromages	Région ciblée (taille de l'amplicon)	Type de séquenceur	Base de données	Découvertes majeures	Références
"Metabarcoding"						
LAIT						
Lait cru		v4 du 16S	Illumina (2x 160pb)	GreenGenes	Microbiote de fin de lactation différent de celui du début et du milieu de lactation.	(McInnis et al., 2015)
CV					Peu d'effet du lysozyme sur le microbiote.	
Lait cru et pasteurisé BF			Illumina Miseq		Modification de la communauté bactérienne au cours de la conservation. <i>Paenibacillus</i> dominant dans le lait pasteurisé à 21 jours de stockage.	(Li et al., 2016 <i>in press</i>)
Lait fermenté (Tarag, Mongolie et Chine)		v3 du 16S (195pb) ITS1	454 FLX	RDP UNITE	Microbiote différent selon l'origine géographique du lait. Présence de 47 genres bactériens et 43 genres fongiques dont <i>Lactobacillus</i> et <i>Galactomyces</i> sont respectivement les plus abondants.	(Sun et al., 2014)
V						
Lait fermenté (Russie)		v1-v3 du 16S v4 du 18S	454 FLX	RDP	Composition bactérienne et fongique différente selon l'origine géographique du lait.	(Liu et al., 2015)
Lait cru de vache en acidose		v1-v3 du 16S	454 FLX	SILVA	Avec une alimentation induisant une acidose, le lait contient une proportion élevée de bactéries pathogènes pouvant induire une mammite et des bactéries psychrotrophes.	(Zhang et al., 2015)
Lait de vache infectée ou non par une mammite		v1-v2 du 16S	454 FLX	SILVA RDP	<i>Brevundimonas</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Sphingomonas</i> et <i>Stenotrophomonas</i> plus abondants dans le lait issu des trayons infectés. <i>Pseudomonas</i> , <i>Psychrobacter</i> et <i>Ralstonia</i> plus abondants dans le lait issu de trayons sains.	(Kuehn et al., 2013)
Canal du tr rayon et premiers jets de lait de vache atteinte ou non de mammite		v3-v4 du 16S (464pb)	454 FLX	RDP GreenGenes	Modification de la communauté bactérienne du tr rayon en fonction de l'histoire des animaux avec une mammite. Bactéries assignées aux classes <i>Bacilli</i> et <i>Chlamydia</i> plus abondantes lors d'une infection.	(Falentini et al., 2016)

Caractérisation de profils de diversité microbienne.

La technique de “metabarcoding” repose sur le séquençage d’une courte région des marqueurs phylogénétiques (ARNr 16S pour les procaryotes et les ARNr 18S et les régions ITS pour les eucaryotes) (O’Flaherty et Klaenhammer, 2011) (**Figure 7**). Il convient de déterminer une région de l’ADN suffisamment variable pour discriminer les taxa au niveau désiré (genre ou espèce) à partir d’une séquence de longueur limitée (500 pb). La région V4 du gène de l’ARNr 16S (~150 pb) serait l’une des plus appropriées pour le NGS puisqu’elle permet de discriminer de manière fiable les bactéries au niveau du genre (Bokulich and Mills, 2012; Quigley et al., 2012). Cependant, plus la taille de l’amplicon séquencé sera grande, plus l’assignation taxonomique pourra être précise, c’est pourquoi la région V4 est souvent associée à une autre région hypervariable de l’ARNr 16S. Pour les champignons, les régions ITS sont fortement adaptées au « metabarcoding » car il s’agit de courtes séquences avec une forte hétérogénéité intraspécifique et intragénétique (Nilsson et al., 2008; Schoch et al., 2012).

Les millions de séquences générées sont regroupés en unités taxonomiques opérationnelles (OTU, *Operational Taxonomic Unit*) sur la base de leur similarité. La séquence de référence de chaque OTU est ensuite comparée à une base de données (Ribosomal Database Project (Olsen et al., 1992), SILVA (Quast et al., 2013), Greengenes (DeSantis et al., 2006), UNITE (Kõljalg et al., 2005)) afin d’obtenir une assignation taxonomique. Le nombre de séquences classées au sein du même OTU est calculé afin de déterminer l’abondance relative de chaque OTU présent dans chaque échantillon analysé (Ercolini, 2013). En raison du nombre de séquences générées, cette méthode semi-quantitative a une profondeur d’analyse plus importante que les méthodes moléculaires citées précédemment (cf. 2.3.2). Elle permet de détecter des OTUs ayant une faible abondance (<0,01%), elle a ainsi permis de révéler entre autres la complexité des communautés microbiennes des laits et des fromages (**Tableau 1**). Plusieurs études ont montré que la composition du microbiote du lait était différente selon l’origine géographique (Liu et al., 2015; Sun et al., 2014), l’alimentation des vaches laitières (Zhang et al., 2015) et l’état sanitaire des animaux (Falentin et al., 2016; Kuehn et al., 2013). L’approche “metabarcoding” a permis la comparaison du microbiote de plusieurs dizaines de variétés de fromages (pâte et croûte) (O’Sullivan et al., 2015b; Quigley et al., 2012; Wolfe et al., 2014). Plusieurs genres bactériens sous-dominants ont pu être détectés pour la première fois dans certains fromages artisanaux tels que *Faecalibacterium*, *Helcococcus* et *Prevotella* dans des fromages irlandais ou encore *Arthrobacter* et *Brachybacterium* dans des fromages au lait de chèvre (Quigley et al., 2012), *Yaniella* et *Nocardiopsis* sur la croûte de certains des 137 fromages issus de 10 pays (Wolfe et al., 2014), et des bifidobactéries dans les fromages Oscypeck (Alegria et al., 2012). La diversité et la dynamique des populations bactériennes au cours de la fabrication fromagère et de l’affinage des fromages ont aussi été étudiées. La diversité bactérienne est plus élevée dans le lait que dans les fromages (Aldrete-Tapia et al., 2014 ;

Tableau 1 (suite)

Produits laitiers (origine du lait ¹)	Variété de fromages	Région ciblée (taille de l'amplicon)	Type de séquenceur	Base de données	Découvertes majeures	Références
Lait cru de cuve		V4 du 16S	Illumina MiSeq (2 x 250 pb)	Greengenes	Diversité bactérienne plus élevée au printemps qu'en été et à l'automne dans les laits collectés.	(Kable et al., 2016)
V					« Core » bactérien composé de 29 taxa et dominé par <i>Streptococcus</i> et <i>Staphylococcus</i>	
Lait cru et fromage au lait cru	PPC	v3-v4 du 16S	454 FLX	RDP	Les bactéries inoculées, <i>L. innocua</i> et <i>S. aureus</i> ont été inhibées dans le fromage contrairement à <i>E. coli</i> .	(Masoud et al., 2012)
Lait cru et fromage au lait cru (Poro, Mexique)	frais	ARNr 16S	454 FLX	SILVA	Diversité bactérienne plus élevée dans le lait cru que dans le caillé et le fromage.	(Aldrete-Tapia et al., 2014)
FROMAGE						
62 fromages au lait cru et pasteurisé (Irlande)	PM PPC PPNC	v4 du 16S (239pb)	454 FLX		<i>Faecalibacterium</i> , <i>Prevotella</i> et <i>Helicococcus</i> détectés pour la première fois dans les fromages.	(Quigley et al., 2012)
BB/CV/V					<i>Arthrobacter</i> et <i>Brachybacterium</i> détectés dans les fromages au lait de chèvre.	
10 fromages au lait cru BB/V	PPC PPNC	Gènes <i>tdc</i> (1100pb) et <i>hdc</i> (≈500pb)	Ion Torrent	NCBI-Nr	Potentiel à produire des amines biogènes de <i>S. thermophilus</i> et <i>Lb. delbreueckii</i> .	(O'Sullivan et al., 2015b)
Fromage au lait cru	PPC	v3-v4 du 16S	454 FLX	RDP	Détection des genres bactériens les plus abondants par DGGE et pyroséquençage.	(Masoud et al., 2011)
					Détection des genres bactériens en faible abondance uniquement par pyroséquençage.	
Fromage au lait cru (Oscypek, Pologne)	nc	v5-v6 du 16S (294pb)	454 FLX	SILVA	Détection des genres bactériens sous-dominants uniquement par pyroséquençage.	(Alegria et al., 2012)
BB					Présence de <i>Bifidobacterium</i> .	
Fromage au lait cru (Mozzarella, Italie)	pâte filée	v1-v3 du 16S (520pb)	454 FLX	GreenGenes	Les bactéries lactiques thermophiles issues des ferments naturels sont les principales responsables de la fermentation.	(Ercolini et al., 2012)
BF						
Fromage au lait cru BB	nc	ARNr 16S (637pb)	454 FLX	SILVA	Le microbiote des fromages affinés dépend de l'origine du lait et de la technologie fromagère.	(Fuka et al., 2013)

Massoud et al., 2011). Delcenserie et al. (2014) ont observé que le microbiote de surface des fromages à pâte molle et à croûte lavée au lait pasteurisé était similaire à celui des fromages au lait cru même si des espèces bactériennes représentant moins de 5% de l'abondance relative totale ont été détectées spécifiquement dans le lait cru (86 phylotypes) ou dans le lait pasteurisé (25 phylotypes). Cette étude démontre l'importance des conditions et de l'environnement de transformation fromagère. En étudiant la distribution temporelle et spatiale (croûte/pâte) des microorganismes dans des fromages à pâte pressée cuite au lait pasteurisé, O'Sullivan et al. (2015a) ont montré que les fromages fabriqués en fin de journée avaient une diversité bactérienne plus élevée que ceux fabriqués en début de journée. L'approche "metabarcoding" a également permis de mettre en évidence une association entre certains microorganismes au sein d'un écosystème complexe comme le fromage (Alessandria et al., 2016; Bassi et al., 2015; Riquelme et al., 2015). Dans ce contexte, le rôle des ferments et des microorganismes auxiliaires a été confirmé (De Filippis et al., 2014; Dolci et al., 2014; Ercolini et al., 2012; Guidone et al., 2016). Les microorganismes qui ne sont pas délibérément inoculés sont fortement représentés sur la croûte des fromages, en particulier les bactéries à Gram négatif (*Halomonas*, *Marinilactibacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter* et *Vibrio*) (Almeida et al., 2014). Le transfert dans les fromages des microorganismes présents sur les surfaces des équipements de la fromagerie et de la cave d'affinage a été suivi (Bokulich and Mills, 2013a). Ces auteurs ont montré que les principaux microorganismes procaryotes et eucaryotes, respectivement *Lactococcus* et *Debaryomyces*, impliqués dans les processus de fermentation du lait étaient retrouvés sur la plupart de ces surfaces.

La limite principale du "metabarcoding" repose sur la difficulté à distinguer des espèces étroitement apparentées en se basant uniquement sur la séquence partielle de gènes ribosomaux (Konstantinidis et al., 2006). Pour remédier à cette difficulté, le séquençage de portions plus longues des marqueurs phylogénétiques et un effort sur le développement de bases de données spécifiques aux produits laitiers et aux environnements de production seraient nécessaires. Cependant, il restera difficile de faire le lien entre la phylogénie et la fonction de chaque microorganisme. Pour explorer les potentialités fonctionnelles des communautés microbiennes, il est aussi possible de séquencer des génomes entiers au sein d'un écosystème complexe.

Etude de la diversité intra-espèce et des potentialités fonctionnelles de souches et de communautés microbiennes.

Le séquençage de génome complet (WGS, *Whole Genome Sequencing*) ou *shotgun* de souches pures a permis l'annotation et l'identification de nouveaux gènes/opérons microbiens (Mayo et al., 2014). Ces informations servent à enrichir les bases de données nécessaires au traitement des données

Tableau 1 (suite)

Produits laitiers (origine du lait ¹⁾)	Variété de fromages	Région ciblée (taille de l'amplicon)	Type de séquenceur	Base de données	Découvertes majeures	Références
Fromage au lait cru et pasteurisé (Herve , Belgique)	PM à croûte fleurie	ARNr 16S	454 FLX	SILVA	Le microbiote de surface des fromages Herve est très diversifié (207 OTUs). 95% des espèces présentes sont présentes dans les fromages au lait cru et au lait pasteurisé.	(Delcenserie et al., 2014)
Fromage au lait cru BF/V	Frais PPC	v1-v3 du 16S (520pb) Gène <i>lacS</i> (≈250pb)	454 FLX	GreenGenes	Le microbiote impliqué dans l'acidification des 3 variétés de fromages est similaire. Pas assez de variabilité dans la séquence du gène <i>lacS</i> pour différencier les souches de <i>S. thermophilus</i> .	(De Filippis et al., 2014)
Fromage au lait cru (Fontina , Italie) V	PPNC à croûte lavée	v1-v3 du 16S (520pb)	454 FLX	GreenGenes	Activité microbienne dans les fromages strictement associée la présence des ferments peu importe de quel stade de lactation est issu le lait.	(Dolci et al., 2014)
Fromage au lait cru (Pico , Portugal) V	Frais	v3-v4 du 16S	454 FLX	SILVA	Augmentation de l'abondance de <i>Lactobacillus</i> concomitante avec la diminution de <i>Acinetobacter</i> et <i>Stenotrophomonas</i> .	(Riquelme et al., 2015)
Fromage au lait cru (Grana Padano , Italie) V	PPC	v3-v4 du 16S	Illumina MiSeq (2 x 300pb)	RDP	Les fromages caractérisés par une abondance élevée de <i>S.</i> <i>thermophilus</i> et <i>Lb. rhamnosus</i> sont altérés par <i>C.</i> <i>tyrobutyricum</i> , et quand <i>Lb. delbrueckii</i> est le plus abondant, les fromages sont altérés par <i>C. butyricum</i> .	(Bassi et al., 2015)
Fromages au lait cru et pasteurisé (Fiore Sardo , Pecorino Siciliano , Pecorino Toscano , Italie) BB	PPNC	v1-v3 du 16S	454 FLX		Corrélation entre la distribution spatiale du microbiome métaboliquement actif et la protéolyse secondaire et la synthèse des composés volatils odorants (COV). Le cœur du fromage a le plus bas niveau de COV.	(De Pasquale et al., 2016)
Fromage au lait cru (Plaisentif , Italie) V	PPNC	v4 du 16S	Illumina MiSeq	GreenGenes	Faible standardisation du fromage, signe d'une production artisanale. A révéler l'ajout de ferment non autorisé dans certains cas.	(Dalmaso et al., 2016)
Fromage au lait cru (Grana , Italie) V	PPC	v1-v3 du 16S	454 FLX	GreenGenes	Développement des bactéries d'altération limité par les bactéries composant le ferment naturel.	(Alessandria et al., 2016)
Fromage (Mozzarella) V	pâte filée	v1-v3 du 16S (520pb)	454 FLX	GreenGenes	Les ferments utilisés par différentes fromageries correspondent au microbiote dominant et différencient les fromages entre eux.	(Guidone et al., 2016)

issues du séquençage de métagénome ou de métatranscriptome. Le séquençage du génome de bactéries pathogènes a révélé des informations vitales sur les mécanismes de virulence et de survie de ces microorganismes dans les aliments (O’Flaherty et Klaenhammer, 2011). En utilisant cette approche, Almeida et al. (2014) ont séquençé le génome de 117 souches bactériennes de référence issues de produits laitiers. Ils ont ensuite comparé les séquences génomiques de 4 souches d’*Arthrobacter* isolées des fromages avec 15 souches isolées de l’environnement. Ils ont mis en évidence exclusivement dans les souches fromagères un cluster de 5 gènes impliqués dans le catabolisme du D-galactonate. Il est aussi possible d’accéder au génome de souches dominantes au sein d’un écosystème ce qui permet d’accéder à leur potentialités fonctionnelles. Wolfe et al. (2014) ont identifié plusieurs voies métaboliques associées à la production de flaveur dans les fromages à croûte lavée. La présence du gène codant pour la méthionine γ -lyase (MGL) a été assignée à *Pseudoalteromonas*, suggérant son rôle dans la production de composés soufrés dans les fromages. La découverte de gènes impliqués dans la production de composés aromatiques et même dans la production de bactériocines dans les fromages Cotija pourrait contribuer à expliquer le rôle de la communauté bactérienne au cours de l’affinage des fromages (Escobar-Zepeda et al., 2016). Porcellato and Skeie (2016) ont observé une plus grande variété de fonctions métaboliques dans les fromages en fin d’affinage qu’au début de l’affinage.

Profils d’expression de gènes au sein de communautés microbiennes

La métatranscriptomique basée sur la technique RNASeq permet de révéler simultanément la composition taxonomique et les fonctions métaboliques exprimées par les microorganismes actifs au sein d’un écosystème complexe. Lessard et al. (2014) ont suivi les activités métaboliques d’une communauté simplifiée sur la croûte d’un Camembert. Ils ont mis en évidence les processus biologiques prédominants (métabolisme des protéines et des lipides, croissance cellulaire, réponse à différents stress, etc...) au cours de l’affinage pour *G. candidum* et *P. camemberti* qui composent la communauté microbienne de ce fromage. Le rôle de *G. candidum* dans la dégradation des caséines et de la matière grasse a été confirmé dans des fromages Livarot fabriqués à partir d’une communauté microbienne plus complexe composée de 5 souches (Dugat-Bony et al., 2015). Ces auteurs ont mis en évidence les activités conjointes de *Lc. lactis* et *K. lactis* concernant la consommation du lactose lors de la première phase d’affinage. Le lactate produit est ensuite consommé par les *D. hansenii* et *G. candidum* pour lesquels des niveaux élevés de transcrits de lactate déshydrogénase ont été détectés. Monnet et al. (2016) ont observé une surexpression des gènes impliqués dans le catabolisme des acides aminés, successivement pour ces deux champignons, dans les fromages Reblochon au lait pasteurisé. L’expression des gènes varie au cours de l’affinage et peut aussi être affectée par les

Tableau 1 (suite)

Produits laitiers (origine du lait ¹)	Variété de fromages	Région ciblée (taille de l'amplicon)	Type de séquenceur	Base de données	Découvertes majeures	Références
Fromages au lait pasteurisé	PM	v1-v3 du 16S	454 FLX	RDP	Présence de <i>Exiguobacterium</i> . La qualité du lait et les conditions de fabrication des fromages jouent un rôle dans la composition du microbiote des fromages.	(Lusk et al., 2012)
Fromages au lait pasteurisé	PPC	v4 de l'ARNr 16S (239pb)	454 FLX	SILVA	Diversité bactérienne plus élevée dans les fromages fabriqués en fin de journée qu'en début de journée. Diversité bactérienne plus élevée sur la pâte que sur la croûte des fromages en fin d'affinage. Présence de <i>Thermus</i> , <i>Pseudomonas</i> et <i>Bifidobacterium</i> .	(O'Sullivan et al., 2015a)
Fromage au lait pasteurisé (Ricotta) V	frais	v3-v4 du 16S	Illumina MiSeq (2 x 300pb)	GreenGenes	Présence de bactéries formant des spores tout au long de la durée de conservation. Isolement d'une souche de <i>Bacillus</i> provoquant une décoloration rose.	(Sattin et al., 2016)
Surface des équipements de fromagerie et fromages	PM à croûte lavée	v4 du 16S ITS1	Illumina MiSeq (2 x 250pb)	GreenGenes UNITE	<i>Debaryomyces</i> et <i>Lactococcus</i> dominants à la surface des équipements. Les microorganismes présents sur ces surfaces dominent sur la croûte des fromages.	(Bokulich and Mills, 2013)
Surface des équipements de fromagerie et fromages	nc	v1-v3 du 16S (520pb) D1-D2 du 26S (540pb)	454 FLX	GreenGenes	Le microbiote des fromages et les voies métaboliques associées sont clairement différents de ceux de la surface des équipements.	(Stellato et al., 2015)
Métagénomique						
Fromages V	PM à croûte lavée et pâte persillée	ADN total région du 16S de 50 pb	Illumina HiSeq (2 x 91 pb) SOLID	BlastN SEED	Création d'un catalogue de 117 génomes de référence issus de produits laitiers. Cluster de 5 gènes impliqués dans le catabolisme du D-galactonate présents exclusivement dans les souches fromagères d' <i>Arthrobacter</i> . Présence de bactéries à Gram négatif (non inoculées) dominantes dans les fromages.	(Almeida et al., 2014)

conditions d'affinage (De Filippis et al., 2016).

Les méthodes classiques basées sur la culture ou sur les empreintes moléculaires ont laissé la place au développement des techniques à haut-débit permettant de s'affranchir des faiblesses des méthodes pionnières en écologie microbienne. L'analyse des données produites par le séquençage à haut-débit reste difficile car il y a encore trop peu de génomes de référence annotés issus des produits laitiers. Ces techniques devraient plus souvent être utilisées de façon concomitante avec la méthode culture-dépendante ce qui permet à la fois d'enrichir les bases de données de séquences génomiques et la mise en collection de nouvelles espèces isolées.

Tableau 1 (suite)

Produits laitiers (origine du lait ¹)	Variété de fromages	Région ciblée (taille de l'amplicon)	Type de séquenceur	Base de données	Découvertes majeures	Références
137 fromages issus de 10 pays (Europe et des Etats-Unis)	Croûte lavée, naturelle et fleurie	v4 du 16S ITS1	Illumina HiSeq (2 x 100pb) Apollo 324	GreenGenes UNITE KEGG	Abondance >1% pour 14 genres bactériens et 10 genres fongiques cultivables sur la croûte des fromages. Mise en évidence de voies métaboliques associées à la production de la saveur sur les fromages à croûte lavée. En co-culture, la présence d'espèces fongiques inhibe la croissance de <i>Staphylococcus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Brachybacterium</i> et <i>Serratia</i> .	(Wolfe et al., 2014)
Fromage au lait cru (Cotija, Mexique) V	PPNC	ADN total	Illumina HiSeq	RDP KEGG	3 genres bactériens dominants et 500 genres sous-dominants regroupés en 31 phyla bactériens et archéens. Présence de gènes impliqués dans la production de composés aromatiques et de bactériocines.	(Escobar-Zepeda et al., 2016)
Fromage au lait pasteurisé	PPC	v3-v4 du 16S	Illumina MiSeq (2 x 300pb)	SILVA SEED KEGG	Augmentation du nombre de fonctions métaboliques détecté au cours de l'affinage	(Porcellato and Skeie, 2016)
"metabarcoding" et Metatranscriptomique						
Fromage au lait pasteurisé (Livarot)	Fromages à croûte lavée	ADN et ADNc total	SOLID	KEGG	Lactose consommé par <i>Lc. lactis</i> et <i>K. lactis</i> . Lactate consommé par <i>D. hansenii</i> et <i>G. candidum</i> . Dégradation des caséines et de la matière grasse par <i>G. candidum</i> . Catabolisme des acides gras induit par <i>G. candidum</i> , <i>C. casei</i> et <i>H. alvei</i> lié à leur développement tardif.	(Dugat-Bony et al., 2015)
Fromages au lait cru et thermisé (<i>Caciocavallo</i> Silano, Italie) V	pâte filée	ADNc total v3-v4 du 16S	Illumina (2 x 150pb)	GreenGenes KEGG	Implication des bactéries lactiques non levains aux activités liées à l'affinage. Les conditions d'affinage modifient le microbiome et l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de la protéolyse, de la lipolyse et des acides aminés.	(De Filippis et al., 2016)

Tableau 1 (suite)

Produits laitiers (origine du lait ¹)	Variété de fromages	Région ciblée (taille de l'amplicon)	Type de séquenceur	Base de données	Découvertes majeures	Références
Metatranscriptomique						
Fromage au lait pasteurisé (Camembert)	PM	ADNc total	454 FLX	Blast2Go KEGG KOG	Métabolisme des protéines, lipides, glucides et acides organiques, la croissance cellulaire et les réponses au stress dominants en début d'affinage pour <i>G. candidum</i> et <i>P. camemberti</i> .	(Lessard et al., 2014)
Fromage au lait pasteurisé (Reblochon)	PPNC	ADNc total v3-v4 du 16S	Illumina MiSeq HiSeq	Silva KEGG	Sur-expression des gènes impliqués dans le catabolisme des acides aminés chez <i>G. candidum</i> , puis chez <i>D. hansenii</i> . Diminution de l'activité cellulaire en fin d'affinage.	(Monnet et al., 2016)

¹Légende : BB : lait de brebis ; BF : lait de bufflonne ; CV : lait de chèvre ; V : lait de vache ; PM : fromages à pâte molle ; PP : pâte pressée ; PPC : fromages à pâte pressée cuite ; PPNC : fromages à pâte pressée non cuite ; nc : non connu nom du fromage ; en gras : AOP

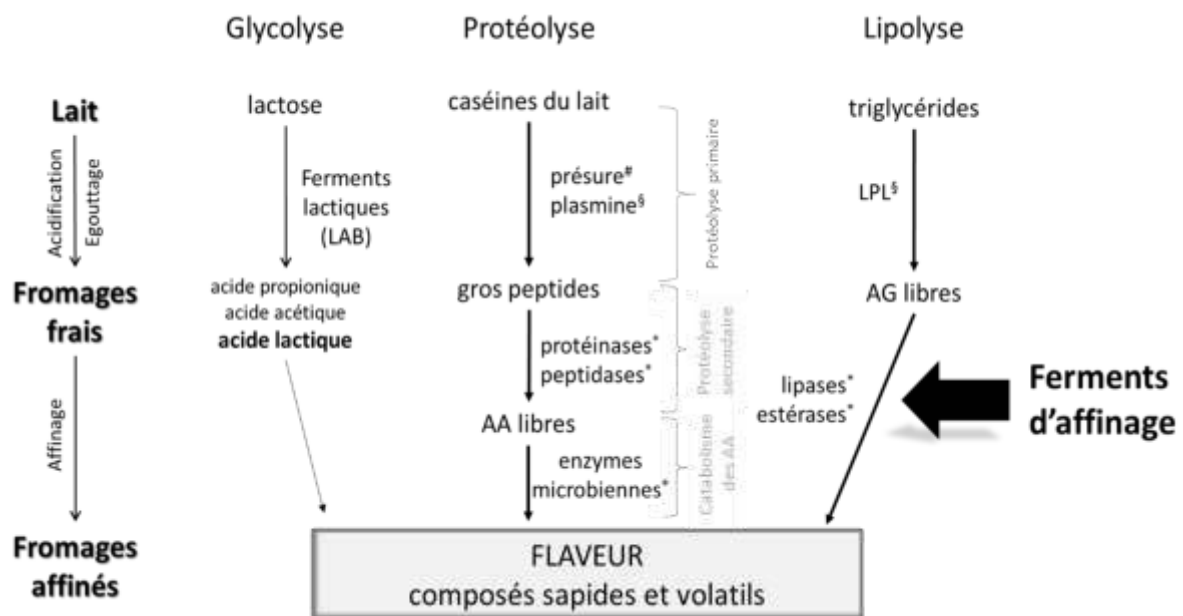


Figure 9. Les principales voies biochimiques conduisant à la production de composés aromatiques au cours de l'affinage des fromages adapté de Marilley and Casey (2004) et McSweeney and Sousa (2000). AA : acides aminés ; LPL : lipoprotéine lipase ; AG : acides gras ; [#]enzymes ajoutées dans le lait ; [§]enzymes présentes naturellement dans le lait ; *enzymes microbiennes

3. Liens entre la composition microbiologique, la composition biochimique et les caractéristiques sensorielles des fromages

La perception sensorielle est un processus complexe qui est influencé par la diversité et la proportion des composés aromatiques, la texture et l'apparence des fromages (Smit et al., 2005). La qualité sensorielle des fromages dépend des procédés de fabrication fromagère mais aussi de la composition microbiologique de la matière première, le lait, en interaction avec sa composante biochimique. L'affinage des fromages est un processus lent qui résulte de modifications des composés majeurs du lait à travers la glycolyse du lactose, la lipolyse et l'oxydation de la matière grasse, et la protéolyse des caséines (**Figure 9**). Ces différentes voies métaboliques impliquent à la fois des enzymes microbiennes et des enzymes naturellement présentes dans le lait. Le développement de la flaveur est attribué essentiellement aux microorganismes qui composent les ferments mais aussi aux microorganismes présents naturellement dans le lait cru (Marilley et Casey, 2004). Les voies métaboliques mises en jeu au cours de l'affinage des fromages sont bien connues mais la fonction de chaque microorganisme n'est pas toujours identifiée. J'aborderai donc les voies métaboliques majeures dans l'affinage en mettant l'accent sur le rôle des principaux groupes microbiens. Puis, je présenterai un état des connaissances sur l'impact potentiel de la composition biochimique du lait, en particulier de la matière grasse, sur le microbiote du fromage.

3.1. Voies métaboliques mises en jeu au cours de l'affinage des fromages

3.1.1. Glycolyse

La glycolyse n'est pas considérée comme la voie métabolique la plus importante dans la formation de la flaveur des fromages (Wilkinson et Kilcawley, 2005). Dans le lait, le lactose est converti en acide lactique *via* les activités enzymatiques des ferments lactiques ce qui accélère la coagulation des caséines et l'expulsion du lactosérum du caillé au cours du processus de fabrication des fromages (Fox et Wallace, 1997). Dans les premiers jours d'affinage, la production d'acide permet aux levures et aux moisissures de coloniser la surface des fromages. Ceci entraîne alors la désacidification de la surface des fromages, puis l'établissement du microbiote de surface dont les activités enzymatiques sont fortement impliquées dans le développement de la flaveur des fromages au cours de l'affinage. L'acide lactique peut réduire la croissance de certains microorganismes indésirables tels que *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* (Holzapfel et al., 1995). Dans les fromages à pâte pressée cuite de type Emmental (ou fromages « à trous »), les

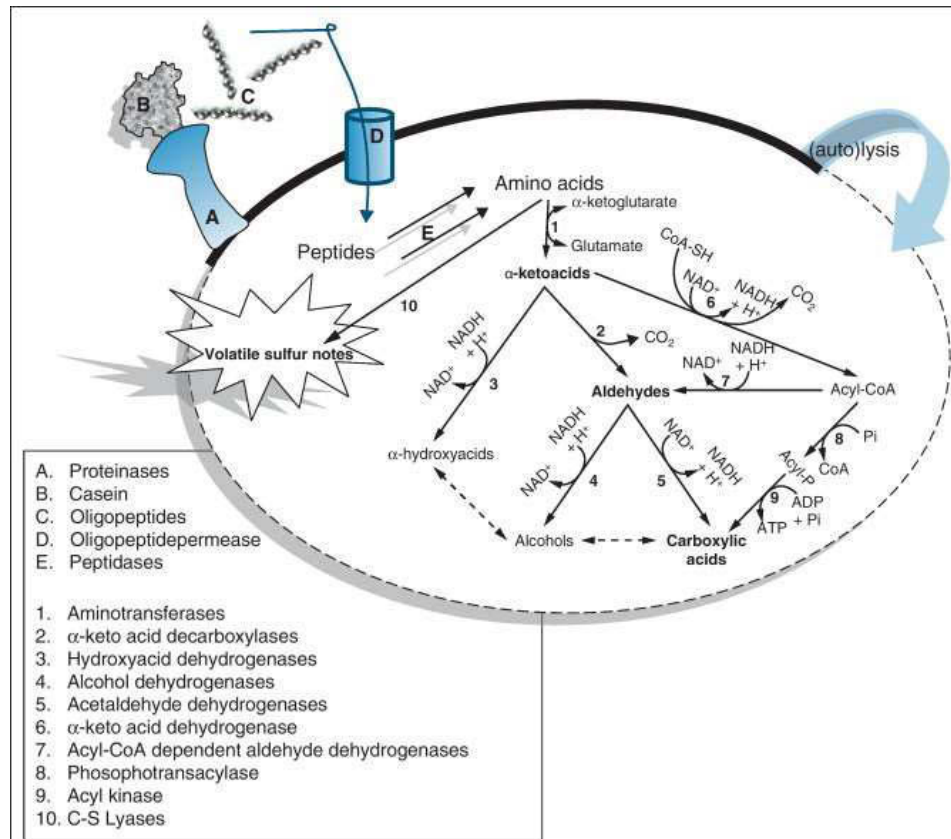


Figure 10. Vue générale de la conversion des protéines en acides aminés (protéolyse), puis en composés impliqués dans la formation de composés aromatiques (Smit et al., 2005; Steele et al., 2013)

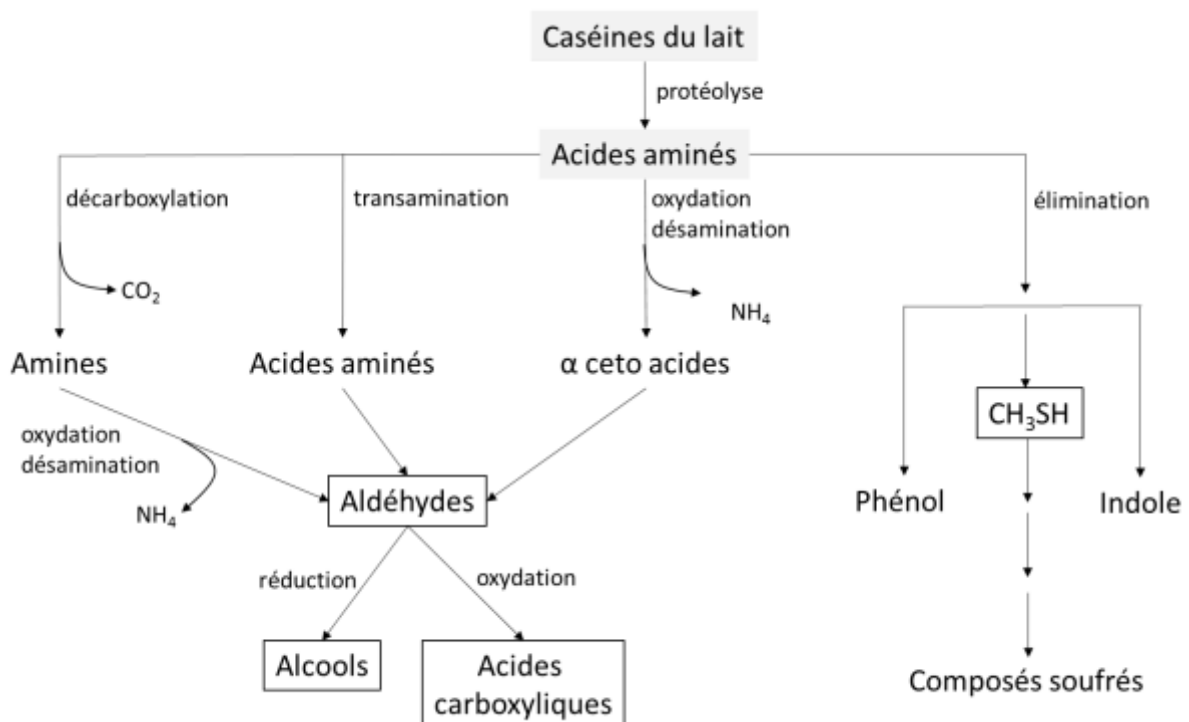


Figure 11. Principales voies de dégradation des acides aminés libres adapté de McSweeney and Sousa (2000)

bactéries propioniques convertissent l'acide lactique en acide propionique, en acide acétique et en dioxyde de carbone. L'acide propionique, et dans une moindre mesure l'acide acétique, contribuent à la flaveur de ces fromages. Le dioxyde de carbone joue un rôle dans l'apparence de la pâte en formant des « trous » typiques des fromages à pâte pressée cuite de type Emmental (Hickey et al., 2015). Certaines levures comme *K. lactis*, *K. marxianus* et *D. hansenii* et les bactéries lactiques peuvent être à l'origine de la formation de composés volatils comme l'éthanol ou l'acétaldéhyde (Fleet, 1990).

3.1.2. Protéolyse

Au cours de l'affinage, la protéolyse est la plus complexe et la plus importante des trois principales voies métaboliques. Elle est responsable du développement de la flaveur *via* la libération d'acides aminés et de petits peptides, et de la formation de la texture des fromages *via* l'hydrolyse des caséines du lait (Fox et Wallace, 1997). Le degré de protéolyse varie en fonction des technologies fromagères et de la durée d'affinage : la protéolyse est limitée dans les fromages frais (Mozzarella) alors qu'elle est intense dans les fromages à pâte persillée. Une flaveur plus intense associée à un niveau plus élevé de bactéries lactiques dans les fromages Cheddar au lait cru que dans ceux au lait pasteurisé suggère que ces bactéries jouent aussi un rôle dans le développement de la flaveur (McSweeney et al., 1993). Bien que les LAB utilisées comme ferment (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*) soient faiblement protéolytiques par rapport aux ferments d'affinage (*P. roqueforti*, *p. camemberti*, *B. linens*, *Propionibacterium* spp.), elles possèdent un système protéinase/peptidase très complet qui leur confèrent la capacité de convertir les caséines du lait en composés aromatiques (McSweeney and Sousa, 1999 ; Wouters et al., 2002).

L'hydrolyse initiale des caséines du lait est causée par la chymosine (présure) et dans une moindre mesure par les enzymes naturellement présentes dans le lait (plasmin) et les protéases extracellulaires associées à la paroi cellulaire des LAB utilisées comme ferment (lactocépine) ce qui conduit à la formation de gros peptides (**Figure 10**). Cette première étape, qualifiée de protéolyse primaire, influence directement la texture des fromages. Les peptides sont ensuite transportés dans les cellules bactériennes où ils sont hydrolysés par des peptidases intracellulaires en acides aminés libres, notamment en acides aminés aromatiques (phénylalanine, tryptophane, tyrosine), en acides aminés à chaîne ramifiée (leucine, isoleucine, valine) ou encore en acides aminés soufrés (méthionine) au cours de la protéolyse secondaire (Marilley et Casey, 2004) : c'est la protéolyse secondaire. Les molécules aromatiques issues du catabolisme des acides aminés sont classées en cinq groupes : les aldéhydes, les alcools, les acides carboxyliques, les thiols et leurs dérivés et les autres composés divers (McSweeney and Sousa, 2000) (**Figure 11**). Ces molécules aromatiques ont été identifiées comme des composés d'arôme majeurs dans différentes variétés de fromage telles que le Cheddar, le Camembert

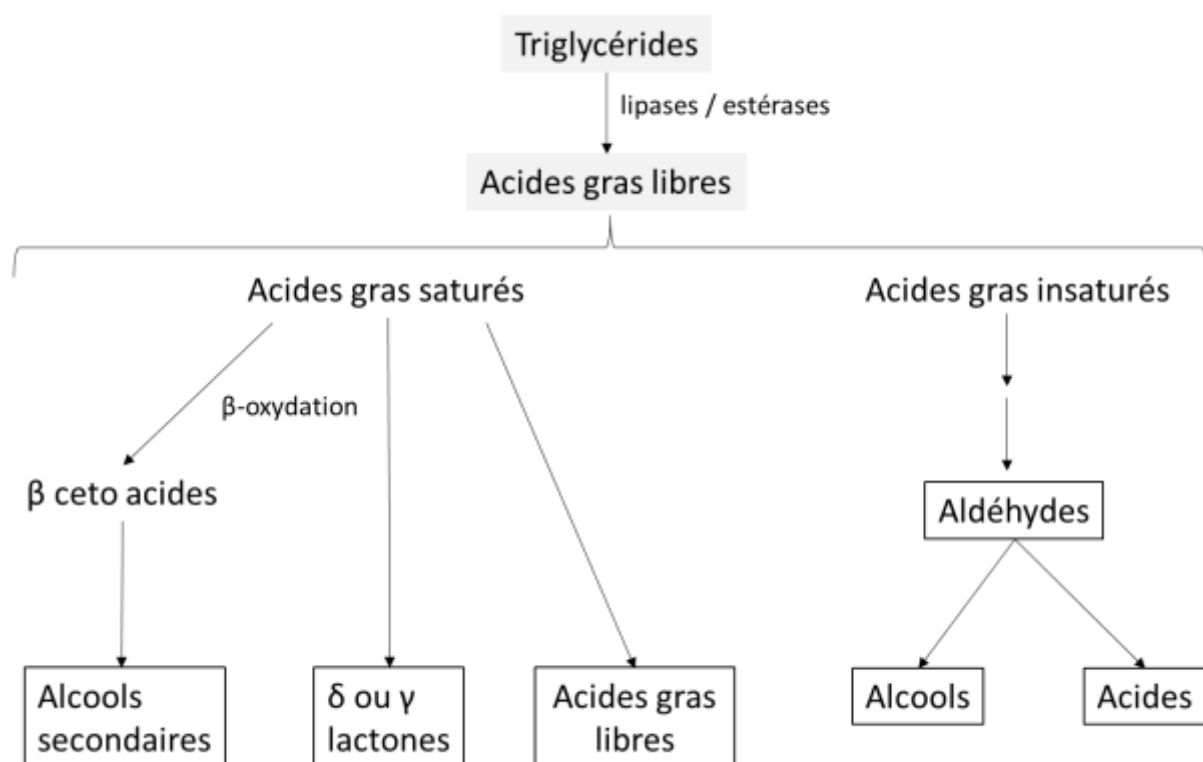


Figure 12. Principales voies cataboliques des acides gras libres dans les fromages (lipolyse) (Molimard and Spinnler, 1996)

et l'Emmental (Corrieu et Luquet, 2008). La capacité de dégradation des caséines du lait en acides aminés libres est variable selon les espèces bactériennes, et même selon les souches au sein d'une même espèce. Parmi les LAB, les souches de *Lc. lactis* ont l'activité protéolytique la plus importante. En comparant des souches de *Lc. lactis* commercialisées en tant que ferment à des souches issues d'environnement non laitier, Ayad et al. (1999) ont découvert que ces dernières avaient une plus grande capacité à synthétiser leurs propres acides aminés. L'absence de certaines voies de biosynthèse des acides aminés dans les souches de *Lc. lactis* laitier pourrait être une conséquence de leur adaptation aux produits laitiers, puisque dans le lait, les acides aminés sont facilement disponibles à partir de la dégradation des caséines (protéolyse). Parmi les levures et les moisissures, *G. candidum* et *P. camemberti* sont les agents les plus protéolytiques rencontrés à la surface des fromages (Wouters et al., 2002). Les bactéries du genre *Brevibacterium* contribuent activement à la production de composés volatils soufrés et elles sont aussi capables de produire des acides gras volatils comme l'acide butyrique et des amines volatiles (histamine, tyramine, diéthylamine, cadavérine) à la surface des fromages (Ratray and Fox, 1999). De Pasquale et al. (2016) ont montré que le profil en composés volatils est plus restreint au cœur qu'à la surface des fromages à pâte pressée non cuite. Cette différence serait liée à la distribution spatiale des microorganismes dans les fromages.

3.1.3. Lipolyse

La matière grasse laitière est essentielle pour la texture et le développement de la flaveur des fromages. En effet, Collins et al. (2003) ont montré que des fromages fabriqués avec du lait écrémé ne développaient pas la flaveur attendue. Les lipides (essentiellement sous forme de triglycérides) peuvent subir une dégradation enzymatique (lipolyse) ou chimique (oxydation) (Fox and Wallace, 1997; McSweeney and Sousa, 2000). Les AGPI sont particulièrement sujets à l'oxydation mais celle-ci reste limitée dans la matrice fromagère en raison de la présence d'antioxydants naturels (notamment la vitamine E) et du faible potentiel redox (- 250 mV). L'hydrolyse enzymatique des triglycérides est réalisée par des estérases actives sur les esters formés avec des acides gras à chaîne courte (C2 à C8) et par des lipases actives sur les substrats contenant des acides gras à plus longue chaîne (>C8). Les acides gras libérés peuvent contribuer directement à la flaveur des fromages et aussi servir de précurseurs pour la formation de composés volatils : les méthylcétones, les esters, les alcools secondaires et les lactones (Collins et al., 2003) (**Figure 12**). Une lipolyse poussée peut entraîner un défaut de rancidité (Fox et al., 2000) de même qu'un fromage allégé en matière grasse peut développer un arôme défectueux (Milo et Reineccius, 1997).

La lipoprotéine lipase (LPL) est une enzyme naturellement présente dans le lait en raison d'un transfert du sang au lait par la glande mammaire (Collins et al., 2003). La LPL participe à la libération

des acides gras à courte et moyenne chaîne (C6 à C12). Son activité est réduite dans les fromages au lait pasteurisé (72°C, 15 s) et elle est complètement inactivée par un traitement thermique à 78°C pendant 10 s (Deeth et Fitz-Gerald, 1983; Driessen, 1989). La lipolyse est particulièrement importante dans les fromages à pâte persillée et les fromages à pâte molle et à croûte fleurie tels que le Brie et le Camembert où *P. roqueforti* et *P. camemberti* sont les principaux agents lipolytiques (McSweeney et Sousa, 2000; Smit et al., 2005). Il est connu que les bactéries propioniques telle que *Propionibacterium freudenreichii* sont 10 à 100 fois plus lipolytiques que les bactéries lactiques (Collins et al., 2003; Mukdsi et al., 2014). En raison de leur important niveau de population dans les fromages, les bactéries lactiques sont considérées comme responsables de la libération d'un nombre non négligeable d'acides gras libres malgré leur faible activité lipolytique comparée à celle des espèces de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Flavobacterium* (Collins et al., 2003). Les enzymes lipolytiques des bactéries lactiques sont majoritairement intracellulaires. L'autolyse des cellules bactériennes (en particulier des LAB utilisées comme ferment) qui résulte de la dégradation enzymatique du peptidoglycane formant la paroi cellulaire par des hydrolases endogènes participe à la libération des enzymes intracellulaires (lipases, peptidases et enzymes du catabolisme des acides aminés) et leur permet d'atteindre les substrats présents dans la matrice fromagère (Lortal et Chapot-Chartier, 2005). Ces enzymes jouent un rôle clé dans le développement de la flaveur des fromages au cours de l'affinage.

3.2. La composition biochimique de la matière grasse laitière peut-elle influencer la croissance et la diversité du microbiote des fromages ?

Le lait est une source de nutriments pour le nouveau-né et contient plusieurs facteurs antimicrobiens. Certains acides gras libres et monoglycérides formés à partir des triglycérides représentant 98% de la matière grasse du lait sont des facteurs antimicrobiens avec un large spectre d'action. Leurs propriétés antimicrobiennes ont été largement étudiées en condition *in vitro*. D'autres facteurs présents dans le lait comme la lactoferrine et la lactoperoxydase mais aussi le lysozyme, les terpènes et les anticorps présentent les mêmes propriétés (Belviso et al., 2013; Pakkanen and Aalto, 1997; van Hooijdonk et al., 2000) mais ils ne seront pas détaillés ici. La composition de la matière grasse laitière peut être facilement modulée par l'alimentation des vaches et la teneur en matière grasse des fromages peut varier selon les technologies fromagères. Dans les deux paragraphes suivants, je présenterai un état des connaissances sur les effets de la teneur et de la composition en acides gras de la matière grasse laitière sur les microorganismes présents ou isolés des laits et des fromages.

Tableau 2. Synthèse des études concernant l'effet de la teneur en matière grasse sur la communauté microbienne des fromages à pâte pressée non cuite (PPNC).

Variété de fromages	Résultats majeurs	Références
Cheddar (PPNC)	Réduction du niveau des ferments lactiques dans les fromages au lait écrémé	Laloy et al. (1996)
Cheddar (PPNC)	Pas d'effet sur les bactéries dominantes Modification de la communauté bactérienne selon la teneur en MG des fromages	Broadbent et al. (2013)
PPNC	Pas d'effet sur les bactéries lactiques et propioniques inoculées	Porcellato et al. (2013)
Cheddar (PPNC)	Pas d'effet sur les ferments lactiques Réduction du niveau des bactéries lactiques non-levains dans les fromages avec une faible teneur en MG	Fenelon et al. (2000)
Edam, Cheddar (PPNC)	Une faible teneur en MG peut être moins favorable à la survie de <i>Bacillus sp.</i> et <i>Salmonella sp.</i>	Hauerlandova et al. (2014) ; Mehta and Tatini (1994)

3.2.1. Effet de la teneur en matière grasse des fromages

La réduction de la teneur en matière grasse modifie aussi bien la flaveur *via* la lipolyse que la texture des fromages. Banks et al. (1989) ont constaté que le manque de flaveur des fromages Cheddar à faible teneur en matière grasse était associé à un faible niveau des acides butanoïque et hexanoïque, et des méthylcétones. La réduction de la teneur en matière grasse est concomitante à l'augmentation de l'humidité dans le fromage. Les effets de la réduction de la teneur en matière grasse sur la croissance et les activités bactériennes dans les fromages ne sont pas élucidés.

Plusieurs études ont été réalisées sur les effets de la teneur en matière grasse du Cheddar, fromage à pâte pressée non cuite, sur la composition microbienne de ce fromage (**Tableau 2**). Laloy et al. (1996) ont montré que la teneur en matière grasse des fromages influence la rétention des bactéries lactiques utilisées comme ferment. Le niveau de ces bactéries lactiques est réduit dans les fromages fabriqués à partir de lait écrémé comparés aux fromages Cheddar fabriqués avec du lait entier. A l'inverse, Fenelon et al. (2000) ont montré que la teneur en matière grasse (6%, 17%, 23% et 33% de matière grasse) a très peu d'effet sur le niveau des bactéries utilisées comme ferment mais le niveau des bactéries lactiques non-levains est significativement plus faible dans les fromages avec une faible teneur en matière grasse (6%) que dans ceux avec 33% de matière grasse jusqu'à 180 jours d'affinage. Pour Porcellato et al. (2013), la teneur en matière grasse (10% et 28% de matière grasse) n'a pas d'influence sur la diversité microbienne ou sur le niveau de bactéries lactiques et propioniques utilisées en tant que ferment. Pour Broadbent et al. (2013), les variations de la teneur en matière grasse sont corrélées à des communautés bactériennes différentes, variables selon les sites de production, mais ces modifications n'ont pas d'effet sur les bactéries dominantes (*Lactobacillus helveticus*, *Lb. plantarum*, *Lc. lactis*, *Lb. casei*, *St. thermophilus*, *E. coli*). D'autres études ont montré que la croissance de deux souches de *Bacillus* (*B. cereus* et *B. subtilis* subsp. *spizizenii*) et deux serovars de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (serovar *Typhimurium* et serovar *Senftenberg*) était plus faible dans les fromages avec une faible de teneur en matière grasse (Hauerlandová et al., 2014 ; Mehta and Tatini, 1994). De manière générale, les acides gras composant la matière grasse des fromages semblent nécessaires à la croissance des bactéries.

3.2.2. Effet de la composition de la matière grasse laitière

Depuis plusieurs décennies, de nombreuses études *in vitro* ont démontré l'effet antimicrobien des acides gras libres (AGL) saturés à chaîne moyenne, des AGL insaturés à longue chaîne et des monoglycérides (ou monoesters) (Bergsson et al., 2011; Kabara et al., 1972; Kato and Shibasaki, 1975; Nieman, 1954). Ces AGL sont peu ou pas toxiques pour les mammifères mais ils sont capables d'inhiber la croissance des bactéries, des levures, des moisissures, des virus et des parasites présents sur la peau

et les muqueuses. Kabara et al. (1972) ont déterminé que l'acide laurique (C12:0), l'acide palmitoléique (C16:1 *n*-7) et l'acide linoléique (C18:2 *n*-6) sont respectivement les AGL saturé, monoinsaturé et polyinsaturé les plus actifs contre les bactéries à Gram positif. Les monoglycérides, en particulier la monolaurine (ou monolaurate de glycérol), ont une activité antibactérienne plus importante que les AGL. Les bactéries à Gram positif se sont révélées plus sensibles aux AGL que les bactéries à Gram négatif. Les levures sont plus sensibles aux AGL à chaîne moyenne (C10 à C12) (Kabara and Marshall, 2005). Les AGL insaturés tendent à avoir un effet inhibiteur plus important que les AGL saturés avec le même nombre d'atome de carbone. L'activité antibactérienne des AGL à longue chaîne est plus importante en présence d'une double liaison (Nieman, 1954). Les AGL de configuration *cis* sont généralement moins inhibiteurs que les isomères de configuration *trans*.

Bergsson et al. (2011) et Desbois et Smith (2010) ont expliqué les différents mécanismes par lesquels les AGL peuvent avoir une action antibactérienne. Ceux-ci pénètrent la membrane externe des bactéries à Gram négatif et la paroi des bactéries à Gram positif réduisant la perméabilité de la membrane cellulaire. L'effet antibactérien des AGL varie selon les espèces bactériennes à Gram négatif. Leur membrane externe peut agir comme une barrière lorsqu'elle est composée majoritairement de lipopolysaccharides. Leur présence rend la surface hydrophile ce qui empêche les molécules hydrophobes comme les AGL de pénétrer dans la membrane. En conditions *in vitro*, l'effet antibactérien des AGL peut être accentué par d'autres facteurs tels qu'un pH acide, une température d'incubation élevée ou lorsque les bactéries sont en phase exponentielle de croissance (Knapp and Melly, 1986; Shibasaki and Kato, 1978).

De nombreuses études ont confirmé l'effet inhibiteur des AGL sur des souches bactériennes isolées des produits laitiers. Kodicek and Worden (1945) ont remarqué que les acides oléique, linoléique et linolénique peuvent inhiber complètement la croissance de *Lb. helveticus* et la production d'acide lactique. Ces auteurs ont constaté que l'acide linoléique inhibe la prolifération de plusieurs souches de bactéries lactiques à Gram positif. Costilow et Speck (1951) et Kairúz et al. (1983) ont montré que les acides caprylique, caprique et laurique (respectivement C8:0, C10:0 et C12:0) inhibent la croissance de *Streptococcus lactis* (aujourd'hui renommé *Lactococcus lactis*), *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. lactis* et *Lb. helveticus*. Cette inhibition est proportionnelle au nombre d'atomes de carbone. L'effet inhibiteur des acides caprique et oléique (respectivement, à une concentration de 1,5 et de 3 mM) sur le métabolisme de souches de *Lc. lactis* entraîne une inhibition de la protéolyse (Poznanski et al., 1968). Altieri et al. (2007) ont constaté que certaines espèces de *Aspergillus* sont plus sensibles à l'effet inhibiteur de l'acide palmitique tandis que certaines espèces de *Penicillium* sont plus sensibles à l'acide myristique. L'ensemble des études a été réalisé *in vitro*, en testant individuellement l'effet inhibiteur des AGL, ou parfois une combinaison de quelques AGL,

Tableau 3. Synthèse des études réalisées dans la matrice laitière et/ou fromagère concernant l'effet de certains acides gras libres et monoesters sur des microorganismes potentiellement présents dans les produits laitiers

Matrice	Résultats majeurs	Références
Lait Caillé	Effet inhibiteur <i>in vitro</i> de l'acide linoléique (C18:2n-6 ; 10 mg/L) sur <i>Propionibacterium freudenreichii</i> (LRTL30) Absence d'effet inhibiteur du C18:2n-6 (5 g/L) dans le lait écrémé et le caillé fabriqué selon la technologie des fromages à pâte pressée cuite	Boyaval et al. (1995)
Fromage à pâte persillée	Concentrations élevées en acides laurique et myristique détectées dans les veines des fromages qui pourraient agir comme bioprotecteur contre <i>Li. monocytogenes</i> et <i>Li. innocua</i>	Kinderlerer et al. (1996)
Mozzarella (fromage frais)	Inhibition de <i>Li. monocytogenes</i> en présence d'acides gras libres (C6:0, C8:0, C10:0, C18:2n-6 et C18:3n-3) dans la solution de conditionnement de la Mozzarella	Petrone et al. (1998)
Lait écrémé	Effet inhibiteur de la monolaurine (100 et 200 µg/mL) sur <i>Listeria monocytogenes</i> dans le lait écrémé à 4°C. Pas d'effet dans le lait entier	Wang et Johnson (1992)
Edam (PPNC)	Effet inhibiteur des monoglycérides (C11:0, C11:1, C12:0) sur les souches de <i>Bacillus</i> (825 mg/100g de MG) dans le fromage. Pas d'effet inhibiteur de la monolaurine (C12:0) dans le fromage	Hauerlandova et al. (2014)
PPNC	2 matières grasses différentes à partir d'un régime alimentaire à base d'herbe (herbe pâturée vs. foin) : pas d'effet de la composition de la matière grasse sur le niveau des groupes microbiens dans les fromages (approche culture-dépendante)	Buchin et al. (1998)

souvent ajoutés en forte concentration dans un milieu de culture ou du lait écrémé stérilisé. Ces effets sont fortement dépendants de la nature des AGL et des espèces bactériennes impliquées (Kabara et al., 1977; Knapp and Melly, 1986). Toutefois, certains AGL semblent capables de stimuler la croissance bactérienne lorsqu'ils sont utilisés à de faibles concentrations (Nieman, 1954). Par exemple, l'acide linoléique stimule la croissance de *Lb. helveticus* à une faible concentration (0,2-2 ppm) mais inhibe sa croissance au-delà de 10 ppm. Harmon and Nelson (1957) ont constaté que des souches de *Lc. lactis* utilisaient l'acide oléique pour leur croissance et Foster et al. (1957) ont montré que l'oléine (monoester d'acide oléique) stimulait la croissance de plusieurs souches de bactéries lactiques, appartenant notamment aux genres *Streptococcus* et *Lactobacillus*.

Les acides gras libres sont naturellement présents dans les produits laitiers, par conséquent plusieurs études ont exploré l'intérêt des AGL contre des bactéries pathogènes, potentiellement présentes dans les produits laitiers (**Tableau 3**). Kinderlerer et al. (1996) ont mesuré des concentrations élevées d'acide laurique (1,77 à 2,50 g/kg de fromage) et d'acide myristique (2,54 à 6,38 g/kg de fromage) dans les veines des fromages à pâte persillée dont la formation est liée à la présence de *P. roqueforti*. Ces auteurs suggèrent que la présence localisée de ces AGS à chaîne moyenne pourrait agir comme bioprotecteur en inhibant la croissance de *Li. monocytogenes* et *Listeria innocua*. Petrone et al. (1998) proposent de compléter la solution de conditionnement utilisée pour le stockage de la Mozzarella en AGS à chaîne moyenne (acides caprylique, caprique et laurique) et en AGI à longue chaîne (acides linoléique et linolénique) à une concentration de 200 µg/mL car après 24 h d'incubation, la croissance de *Li. monocytogenes* est inhibée. Cette supplémentation en acides gras pourrait participer à la conservation de ces fromages. Wang et Johnson (1992) ont démontré que la monolaurine (monoester de l'acide laurique) inhibe la croissance de *Listeria monocytogenes* dans le lait écrémé réfrigéré. Ils n'ont pas observé d'effet inhibiteur de la monolaurine dans le lait entier et ils ont suggéré que la teneur élevée en matière grasse pouvait avoir un rôle protecteur sur *Li. monocytogenes*. Hauerlandová et al. (2014) ont également constaté une forte diminution de l'activité inhibitrice de la monolaurine sur *B. cereus* et *B. subtilis* dans des fromages expérimentaux par rapport aux résultats obtenus dans les conditions *in vitro*.

Seuls quelques auteurs se sont intéressés à l'effet inhibiteur des AGL sur certains microorganismes inoculés dans le lait et le fromage (**Tableau 3**). Bien que l'activité inhibitrice de l'acide linoléique sur les bactéries propioniques ait été mise en évidence *in vitro*, Boyaval et al. (1995) ont montré que l'action inhibitrice de cet AGL ne se retrouve ni lors de culture sur lait écrémé (reconstitué à partir de poudre) ni dans des caillés fabriqués à partir de lait microfiltré selon la technologie des fromages à pâte pressée cuite. Certaines substances présentes dans les produits laitiers pourraient agir comme des agents protecteurs contre l'action antimicrobienne des acides gras et de leurs dérivés.

Effectivement, leur activité peut être diminuée ou complètement bloquée par la présence d'amidon, de sérum albumine, de phospholipides ou de cholestérol (Davidson et al., 2005). Chamberlain et al. (1991) ont montré une corrélation entre la production de caroténoïdes par *Staphylococcus aureus*, la stabilité de sa membrane cellulaire et sa résistance à l'acide oléique. A notre connaissance, seuls Buchin et al. (1998) ont évalué l'impact de la composition de la matière grasse sur les niveaux des principaux groupes microbiens dans les fromages à pâte pressée non cuite. Leurs niveaux n'ont pas été modifiés selon la composition de la crème issue soit de vaches conduites au pâturage, soit de vaches nourries avec une ration à base de foin. Pour conclure, de nombreuses études réalisées *in vitro* soulignent l'effet inhibiteur des AGL mais ces résultats sont difficilement extrapolables à la matrice laitière et fromagère.

4. Synthèse générale

Les caractéristiques biochimiques et sensorielles des fromages se construisent sous l'influence des systèmes de production du lait et des procédés de fabrication fromagère qui déterminent la composition biochimique et microbiologique de la matière première. L'alimentation des vaches laitières est le moyen d'action le plus efficace pour moduler, à court terme et de façon réversible, la composition en acides gras du lait. La nature des fourrages (herbe pâturée *versus* herbe conservée ou ensilage de maïs) et la complémentation en concentré ont des effets importants et variables, le stade de maturité de l'herbe pâturée a un effet moindre, enfin la diversité botanique de l'herbe a peu d'effet. Les effets de l'alimentation sur la composition de la matière grasse laitière sont largement documentés, contrairement à son effet sur le microbiote du lait.

Des études récentes ont montré que les sources d'ensemencement du lait pouvaient être multiples. La présence de plusieurs groupes et espèces microbiennes sur la peau des trayons et dans la machine à traire, l'alimentation, les zones de couchage, l'eau potable et l'eau de lavage, l'air de la stabulation ou de la salle de traite ainsi que dans les laits crus suggère que les environnements de ferme pourraient être des réservoirs de diversité microbienne pour les laits. Notre connaissance de ces réservoirs microbiens est encore insuffisante pour hiérarchiser l'importance de ces environnements dans la constitution des équilibres microbiens du lait.

Avec l'essor des techniques de séquençage à haut-débit, nous pouvons accéder à une importante quantité de données génétiques qui contribuera à une meilleure compréhension de la diversité phylogénétique et fonctionnelle des communautés microbiennes des écosystèmes complexes comme le lait et le fromage. Toutefois, la communauté scientifique se heurte encore à certains verrous techniques : les approches basées sur le séquençage partiel de marqueurs phylogénétiques (ARNr 16S et ITS) ne permettent pas toujours de discriminer les micro-organismes au niveau de l'espèce, et encore moins au niveau de la souche, tandis que l'exploitation des données de métagénome ou de métatranscriptome est limitée par la faible disponibilité de génomes de référence annotés issus des produits laitiers dans les bases de données.

La composition de la communauté microbienne du lait cru évolue à travers une succession de différents groupes microbiens au cours du processus de fabrication des fromages et joue un rôle prépondérant dans le développement de leurs caractéristiques sensorielles. Au début du processus de fabrication, les bactéries lactiques (particulièrement les ferments) se développent rapidement et produisent de l'acide lactique dans le lait. Au cours des premiers jours d'affinage, les levures et les moisissures colonisent la surface des fromages et utilisent le lactate. La désacidification de la surface des fromages permet la croissance des bactéries de surface. La diversité, l'abondance et l'activité de

chaque espèce/souche microbienne au cours de l'affinage des fromages sont à l'origine de la production d'une variété de composés volatils aromatiques impliqués dans le développement de la flaveur des fromages. Certes, les activités microbiennes sont impliquées dans les voies métaboliques (fermentation lactique, lipolyse et protéolyse) conduisant à la maturation des fromages, mais la composition physico-chimique des laits, et plus précisément la matière grasse laitière, pourrait influencer la structure et la dynamique de la communauté microbienne des laits et des fromages. Selon les auteurs, la teneur en matière grasse des fromages peut affecter certains groupes microbiens. De plus, les AGS à chaîne moyenne et les AGI à chaîne longue sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes. Leur efficacité *in vitro* est variable selon la longueur de la chaîne de carbone, le nombre de double liaison ou encore leur configuration *cis* ou *trans*. Les quelques études réalisées sur des modèles fromagers expérimentaux, en général supplémentés avec un ou plusieurs acides gras, ont montré une faible influence des acides gras sur la croissance d'un groupe bactérien particulier. Il reste encore beaucoup de connaissances à acquérir sur les facteurs qui régissent l'assemblage du microbiote des laits crus et des fromages, sa dynamique et l'expression de ses fonctionnalités dans les fromages. Les interactions mises en jeu entre le microbiote des fromages et la matière grasse laitière ainsi que ses conséquences sur l'élaboration des caractéristiques sensorielles des fromages n'ont pas encore été explorées en profondeur.

Objectifs et stratégie scientifique

1. Problématique

Les effets des conditions de production du lait sur les propriétés sensorielles des fromages ont fait l'objet de nombreuses études au cours des dernières années. Les effets de l'alimentation des animaux ont été les plus étudiés : des modifications, parfois importantes, de l'aspect de la croûte et de la pâte, de la texture ou de la flaveur des fromages affinés ont été observées selon les grands types de régimes alimentaires. La nature et l'importance de ces effets varient selon le modèle fromager, les conditions de transformation ou encore la durée d'affinage des fromages. La généralisation de ces effets est ainsi délicate dans la mesure où ils restent mal compris, notamment en ce qui concerne la flaveur. Ces effets sont dus à des modifications des caractéristiques biochimiques et microbiologiques du lait, liées à l'alimentation des animaux. Sur le plan biochimique, la matière grasse laitière dont la composition est connue pour varier grandement en fonction du régime alimentaire, explique en partie les changements de texture et de flaveur (Bovolenta et al., 2014 ; Coppa et al., 2011a). Jusqu'à présent, bien que la majorité des travaux ait été réalisée sur des fromages au lait cru, peu d'attention a été portée au microbiote du lait pour expliquer l'influence de l'alimentation des vaches sur les caractéristiques sensorielles des fromages. Pourtant, certaines observations suggèrent que les effets du régime alimentaire sur les caractéristiques sensorielles des fromages sont réduits lorsque le lait est pasteurisé. Ceci pourrait s'expliquer par la réduction de la diversité et des activités microbiennes du lait lorsqu'il est pasteurisé. Les composantes biochimique et microbiologique du lait sont également susceptibles d'interagir et de modifier les caractéristiques sensorielles des fromages : les AGS à chaîne moyenne et les AGI à chaîne longue sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes, pourtant jamais mises en évidence, à notre connaissance, dans un écosystème aussi complexe que le fromage. Les connaissances sur les réservoirs microbiens des environnements de la ferme au lait, et sur les interactions entre les composantes biochimique et microbiologique des laits, sont encore insuffisantes pour comprendre les effets des conditions de production du lait sur la diversité et les activités microbiennes dans les laits et les fromages.

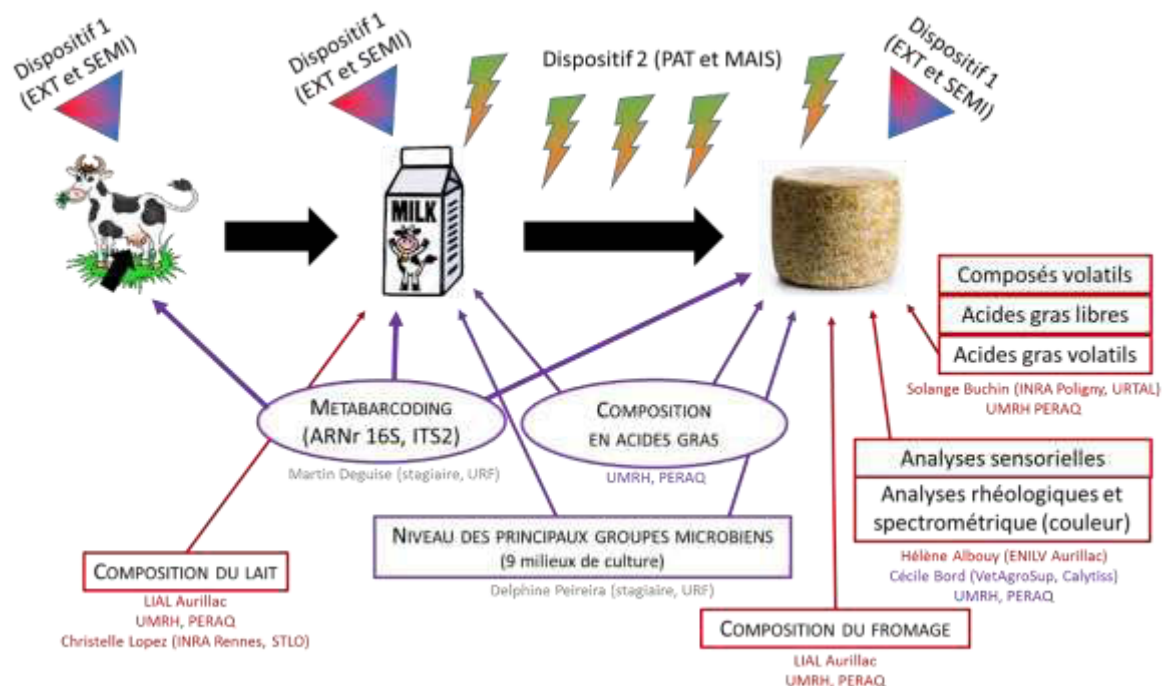
2. Hypothèses de recherche et objectifs

Les effets de l'alimentation des vaches laitières sur la flaveur des fromages affinés sont encore mal compris. La flaveur d'un fromage dépend de l'équilibre des composés sapides et volatils issus des différentes voies métaboliques (protéolyse, lypolyse, glycolyse) mises en jeu au cours de l'affinage. Les enzymes microbiennes et celles naturellement présentes dans le lait (plasmin, lipoprotéine lipase) ont un rôle central dans ces voies métaboliques. Les sources de microorganismes du lait au fromage sont nombreuses. A ce jour, la peau des trayons est considérée comme l'une des principales sources d'ensemencement du lait cru. Au niveau technologique, les effets de l'alimentation sur la flaveur des fromages sont limités lorsque le lait est pasteurisé puisque la diversité microbienne et les activités microbiennes associées sont réduites. Nous faisons l'hypothèse que l'effet des systèmes de production du lait sur le développement de la flaveur des fromages peut s'expliquer par des effets de l'alimentation sur i/ la structure du microbiote du lait *via* la peau des trayons des vaches ou ii/ le développement du microbiote dans le fromage en réponse à la modification de la composition biochimique du lait.

Le but de ces travaux de doctorat est de mieux appréhender les effets des systèmes de production maximisant l'utilisation du pâturage sur les caractéristiques sensorielles des fromages, en ciblant les interactions potentielles entre les communautés microbiennes du lait et la composition de la matière grasse laitière.

Afin de vérifier les hypothèses formulées et atteindre le but de ce projet, deux objectifs ont été fixés :

- **Etudier l'assemblage de la communauté bactérienne de la peau des trayons jusqu'aux fromages affinés selon l'alimentation des animaux.**
- **Explorer le rôle de la matière grasse laitière sur la dynamique des communautés microbiennes des laits aux fromages**



en violet : prise en charge des analyses ou participation aux analyses ; **en marron** : collaboration ou analyses sous-traitées

Tâches	Approches	Dispositif 1 Système extensif (EXT) versus système semi- intensif (SEMI)	Dispositif 2 Pâturage (PAT) versus ensilage de maïs (MAIS)
Déterminer le niveau des principaux groupes microbiens ¹		Laits et fromages affinés	Dynamique des laits aux fromages affinés
Déterminer la diversité et les équilibres microbiens	"metabarcoding" 16S	Trayons Laits et fromages affinés	Dynamique des laits aux fromages affinés
	"metabarcoding" ITS2		Dynamique sur la croûte des fromages
Déterminer la composition biochimique et enzymatique	Composition en acides gras totaux	Laits et fromages affinés	Dynamique des laits aux fromages affinés
	Composition en acides gras volatils	Fromages affinés	Fromages affinés
	Composition en acides gras libres		Fromages affinés (pâte et croûte)
	Profil des composés volatils		Fromages affinés
Analyse physico-chimique des laits ² et des fromages ³		✓	✓
Analyse sensorielle des fromages affinés (à J150)		✓	✓

Figure 13. Stratégie adoptée pour répondre aux objectifs associés à chaque dispositif.

¹ Flore mésophile aérobique revivable (PCAM), bactéries lactiques (MRS), Lactobacilles mésophiles hétérofermentaires facultatifs (FH), *Leuconostoc* producteur de dextrane (MSE), bactéries à Gram positif et catalase positive (CRBM), bactéries à Gram négatif (PCAI), *Enterobacteriaceae* (VRBG), *Enterococcus* (SB), levures et moisissures (OGA).

² Composition physico-chimique du lait : taux butyreux et protéique, pH, lactose, calcium, phosphore, urée, cellules somatiques, germes totaux, lipolyse, caséine, couleur, lipoprotéine lipase (LPL), taille des globules gras.

³ Composition physico-chimique du fromage : matière sèche, pH, teneur en matière grasse, calcium, phosphore, chlorures, composition en caséines et fractions azotées, activité de l'eau

3. Stratégie et moyens mis en œuvre

Le Cantal, fromage à pâte pressée non cuite, a été choisi comme modèle d'étude. Verdier-Metz et al. (2005) ont montré que l'effet du régime alimentaire des vaches sur les caractéristiques sensorielles des fromages était plus marqué sur les fromages de type Cantal que sur les fromages de type Saint-Nectaire dont le format est plus petit et le temps d'affinage plus court. Dans les fromages de grand format comme le Cantal, la maturation se passe essentiellement au cœur du fromage, les caractéristiques du lait semblent donc avoir une influence plus forte sur les caractéristiques sensorielles des fromages affinés.

Pour répondre au premier objectif, nous nous sommes appuyés sur une **expérimentation « système »** mise en place à l'unité expérimentale des Monts d'Auvergne (UE1414 Herbipôle) depuis 2011 qui comprenait deux lots de vaches gérés indépendamment selon un système extensif (**EXT**) et un système semi-intensif (**SEMI**) que je considérerai comme le dispositif 1. Dans un contexte de moyenne montagne, les systèmes d'élevage contribuent à la valorisation des territoires herbagers d'altitude et à la production de fromages typiques liés au terroir. Cette expérimentation « système » consistait à concevoir un **système de production laitier innovant sur le long terme**, répondant à des critères : environnementaux (limitation des intrants alimentaires et des fertilisants minéraux, maintien de la biodiversité), mais aussi économiques (limitation des coûts de production, autonomie fourragère) et sociaux (impact sur l'organisation du travail, etc...). Du point de vue de l'écologie microbienne, nous faisons l'hypothèse que cette expérimentation « système » sur le long terme a **favorisé l'adaptation de la structure des communautés microbiennes à l'environnement propre à chaque système**, permettant ainsi de maximiser les différences de composition de la communauté microbienne des trayons entre les deux lots d'animaux. L'assemblage des communautés bactériennes du trayon des vaches jusqu'aux fromages affinés au sein des deux systèmes a été étudié par une approche "metabarcoding".

Pour répondre au second objectif et dans le but de maximiser les différences de composition de la matière grasse laitière, nous avons mis en place un autre dispositif expérimental (dispositif 2) où **des fromages de type Cantal ont été fabriqués à partir du même lait écrémé de composition microbiologie et biochimique identique et de deux crèmes avec une composition en acides gras différente.** Pour cela, nous avons constitué deux lots de vaches, l'un conduit au pâturage composé des vaches des systèmes EXT et SEMI (**PAT**) et l'autre recevant une ration à base d'ensilage de maïs (**MAIS**). La matière grasse laitière des vaches conduites au pâturage est plus riche en AGI alors que celle des vaches nourries à l'ensilage de maïs est plus riche en AGS.

Pour répondre aux objectifs, plusieurs prélèvements ont été réalisés à partir de chaque dispositif. Comme le montre la **Figure 13**, ces prélèvements ont été effectués sur des habitats différents (trayons, laits et fromages) pour le dispositif 1 alors qu'ils ont été effectués à plusieurs étapes de la fabrication et de l'affinage des fromages (lait, tome au broyage, tome en entrée cave, à 15, 30, 90 et 150 jours d'affinage) pour le dispositif 2. Les analyses réalisées sur chaque prélèvement seront détaillées dans la partie III.

Matériel et méthodes

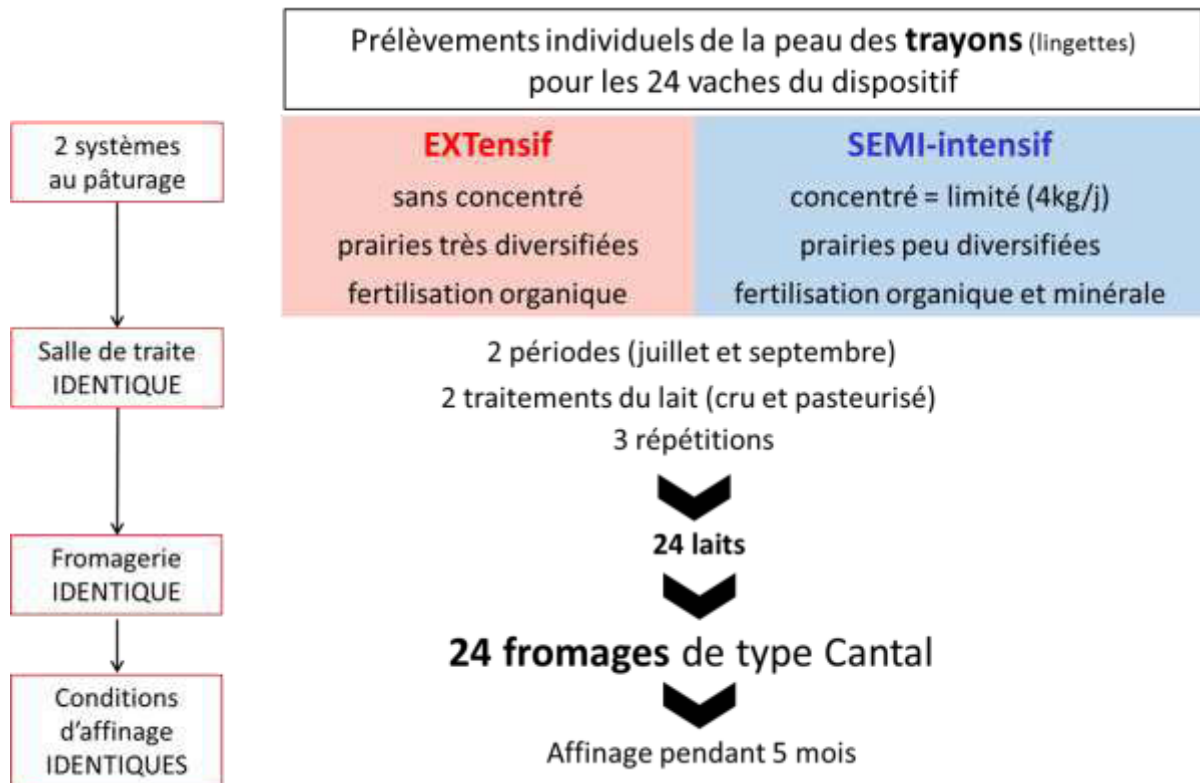


Figure 14. Expérimentation système maximisant l'utilisation de l'herbe : système extensif (EXT) versus système semi-intensif (SEMI) (Dispositif 1)

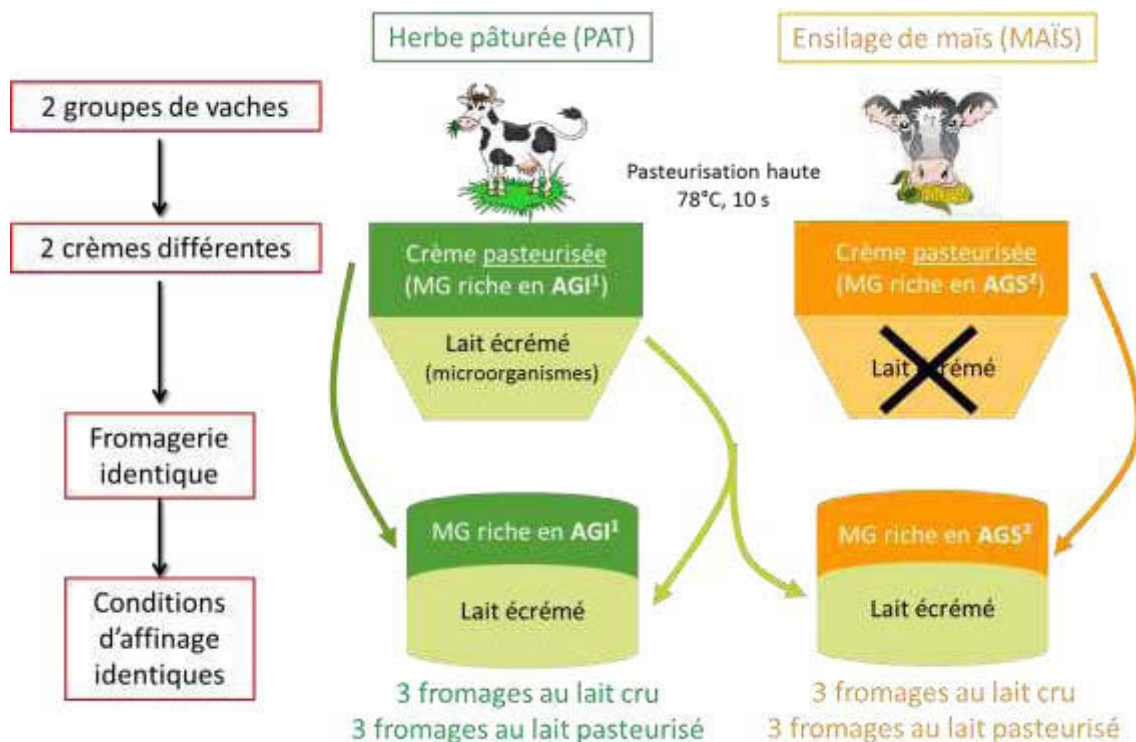


Figure 15. Dispositif expérimental élaboré pour obtenir des laits avec une composition en acides gras différente : pâturage (PAT) versus ensilage de maïs (MAÏS) (Dispositif 2)

Abréviations : MG = matière grasse ; ¹acides gras insaturés ; ²acides gras saturés

1. Les dispositifs expérimentaux et les fabrications fromagères

1.1. Dispositif expérimental « système » au pâturage

L'étude réalisée en 2012 sur ce dispositif expérimental comprenait deux lots de vaches équilibrés au niveau de la race (Holstein et Montbéliarde) et de la parité (multipares et primipares) et gérés indépendamment selon un système extensif (**EXT**) ou semi-intensif (**SEMI**) (**Figure 14**). Les caractéristiques de chaque système et le procédé de fabrication des fromages sont détaillés dans la publication (page 100). Brièvement, les vaches du **système EXT** ont pâturé une **prairie diversifiée** (en moyenne, 61 espèces botaniques différentes dans la parcelle) ne recevant pas de fertilisation minérale et aucun concentré n'a été ajouté à leur alimentation. Les vaches du **système SEMI** ont pâturé une **prairie moins diversifiée** (en moyenne, 37 espèces botaniques différentes) et ont reçu **4 kg de concentrés** par jour et par vache distribués dans une auge collective après la traite du matin. Les vaches des deux systèmes (EXT et SEMI) ont été traitées **avec la même machine à traire**. Les fabrications de fromages ont été réalisées à **deux périodes**, Juillet et Septembre, où **le stade de maturité de l'herbe était différent**. A chaque période, **trois jours de fabrication** ont été répartis sur une semaine. Chaque jour précédant la fabrication des fromages, des prélèvements individuels de la peau des trayons avec des lingettes stériles humides ont été effectués comme détaillé dans l'article (page 114). Les fabrications ont été réalisées avec un lait de mélange de la traite de la veille au soir et de celle du matin de fabrication. Chaque jour de fabrication, le lait de mélange des vaches EXT et SEMI était transformé en parallèle et **la moitié du lait** issue chaque système a été **pasteurisée** (72°C, 20 s). Les **24 fromages de type Cantal** ont été fabriqués dans **la même fromagerie expérimentale** à Aurillac (UR 545) et affinés pendant 20 semaines (soit 150 jours) dans **la même cave d'affinage**. Ces fabrications ont été effectuées avant le début de ma thèse.

1.2. Dispositif expérimental avec deux régimes alimentaires différents

Ce dispositif était constitué de deux lots de vaches, l'un conduit au **pâturage** composé des vaches des systèmes EXT et SEMI (**PAT**) et l'autre recevant une ration à base d'**ensilage de maïs (MAIS)** (**Figure 15**). La race, la parité et le stade de lactation étaient équilibrés pour ces deux lots de vaches. Le lait utilisé pour les fabrications fromagères a été produit par les 28 vaches PAT et les 12 vaches MAIS. Les vaches ont été traitées avec **la même machine à traire** à 6h30 et 16h30. Toutes les vaches PAT ont reçu une solution émoulliente ne contenant pas d'agent anti-microbien (glycérol à 85% stérile) par post-trempage sur la peau des trayons après chaque traite tandis que les vaches MAIS ont reçu un trempage sur-gras.

Les fabrications fromagères ont été réalisées avec le lait de mélange des deux traites de la veille (matin et soir). Le lait a été conservé dans un tank à 4°C avant d'être livré le matin du jour de fabrication (à Aurillac). **Les fabrications ont été réalisées sur 3 jours consécutifs** pendant deux semaines (14-15-16 octobre 2014 et 21-22-23 octobre 2014). Chaque jour de fabrication, le lait des deux lots (PAT et MAIS) a été écrémé, la crème et le lait écrémé ont été séparés. La crème de chaque lot a été pasteurisée (70°C, 30 min). Le **lait écrémé PAT** a été mélangé d'une part avec **la crème pasteurisée issue de PAT**, et d'autre part avec **la crème pasteurisée issue de MAIS**. La crème a été incorporée au lait écrémé PAT à une concentration de 39 g/L de matière grasse dans le lait de cuve. La fabrication de petits fromages de type Cantal (10 kg) a été réalisée dans la même fromagerie expérimentale (UR 545 à Aurillac) comme décrit dans la publication (page 100). Au total, **6 fromages au lait cru avec deux matières grasses différentes** ont été produits lors de la 1^{ère} semaine de fabrication, et **6 fromages au lait pasteurisé** (lait écrémé pasteurisé à 78°C pendant 10 s) **avec deux matières grasses différentes** lors de la 2^e semaine. Ces fromages ont ensuite été affinés dans les mêmes conditions.

2. Les analyses

2.1. Analyses physico-chimiques du lait

Les échantillons du lait de cuve utilisé pour les différentes fabrications fromagères ont été prélevés avant l'ajout des ferments lactiques et des ferments d'affinage. Les analyses physico-chimiques effectuées sur les laits (**Figure 13**, page 82) ont été détaillées dans la publication (page 100).

Des analyses supplémentaires ont été réalisées sur le lait de cuve du dispositif 2. Les teneurs en urée, calcium, phosphore et caséines ont été déterminées comme décrit par Martin et al. (2009) et la couleur du lait a été mesurée comme décrit par Verdier-Metz et al. (1998). La taille des globules gras du lait a été mesurée par diffusion de la lumière laser en utilisant un appareil MasterSizer (Marlvern, UK) comme décrit par Lopez et al. (2014).

2.2. Analyses physico-chimiques du fromage

Après l'affinage, les fromages ont été coupés et divisés en plusieurs morceaux pour les analyses physico-chimiques (**Figure 13**, page 82) détaillées dans la publication (page 100).

Des analyses supplémentaires ont été réalisées sur les fromages affinés du dispositif 2. La teneur en chlorures a été déterminée comme décrit par Lerch et al. (2015). L'activité de l'eau (A_w) a été mesurée en utilisant un instrument LabMaster-aw (Novasina, Suisse).

2.3. Analyses en acides gras totaux, en acides gras volatils et en acides gras libres

La composition en acides gras totaux des laits et des fromages a été mesurée comme décrit par Lerch et al. (2015). La composition en acides gras volatils (AGV) des fromages en fin d'affinage (à 150 jours d'affinage) a été mesurée comme décrit par Bugaud et al. (2001b). La composition en acides gras libres de la pâte et la croûte des fromages en fin d'affinage (à 150 jours d'affinage) du dispositif 2 a été déterminée par chromatographie gazeuse comme décrit par De Jong and Badings (1990). Pour chaque dispositif, les différents échantillons analysés sont précisés sur la **Figure 13** (page 82).

2.4. Analyse en composés volatils

Pour le dispositif 2, les composés volatils neutres ont été analysés en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse après extraction par Purge and Trap. 5 g de fromage ont été homogénéisés dans 50 mL d'eau UHQ désodorisée à l'aide d'un Ultraturrax. 10 mL de cette suspension ont été versés dans une cartouche en verre connectée à l'appareil de Purge and Trap (Tekmar 3000, Agilent Instruments, Les Ulis, France). L'extraction a été réalisée à 45°C pendant 45 min avec de l'hélium à un débit de 40 mL/min sur un piège Tenax à 37°C. La désorption du piège s'est faite

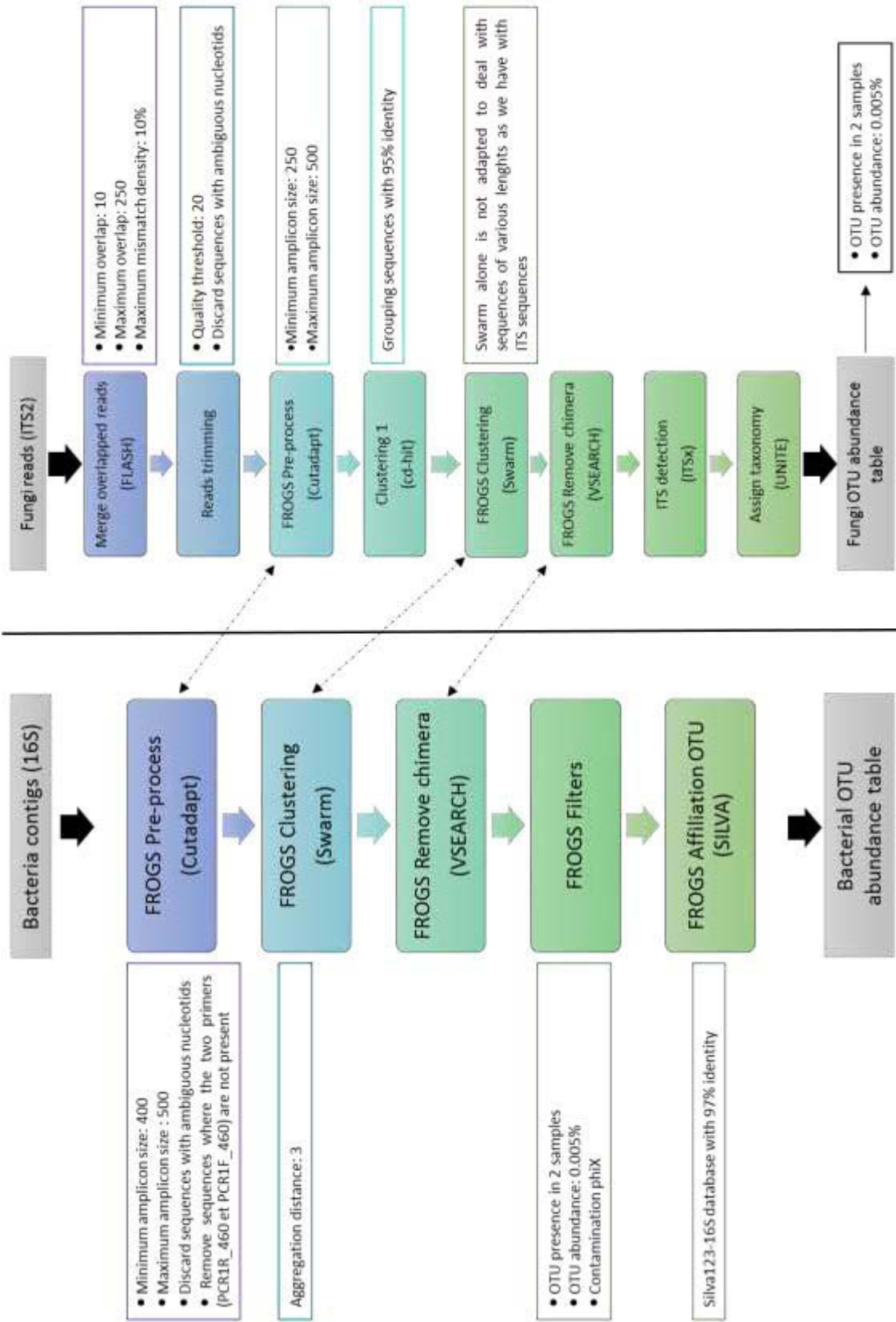


Figure 16. Workflow et paramètres appliqués pour l'analyse des données de "metabarcoding" concernant l'étude de la communauté bactérienne et de la communauté fongique.

à 225°C et l'injection dans le chromatographe à l'aide d'un cryo-concentrateur. Le chromatographe (HP6890, Agilent Instruments, Les Ulis, France) était équipé avec une colonne capillaire de type DB5 (RTX5 Restek, Lisses, France), 60 m long, 0,32 µm diamètre et 1 µm épaisseur. Le débit d'hélium était de 2 mL/min, la température du four était de 40°C pendant 6 min puis augmentait de 3°C/min jusqu'à 230°C. Le détecteur de masse (MSD5973, Agilent Instruments) était utilisé en mode scan, de 29 à 206 de masse atomique et à 70 eV. Les composés ont été identifiés comme décrit par [Callon et al. \(2011\)](#). Chaque composé a été semi-quantifié en unité arbitraire de surface d'un ion spécifique et la quantité exprimée en log (unité arbitraire de surface).

2.5. Analyses microbiologiques

Ces analyses ont été précédemment détaillées dans la publication (page 101). Pour chaque dispositif, les différents échantillons analysés sont précisés sur la **Figure 13** (page 82).

2.6. Analyse "metabarcoding"

La communauté bactérienne a été étudiée dans les deux dispositifs tandis que la communauté fongique a été étudiée uniquement sur la croûte des fromages du dispositif 2. Au vu du faible niveau de populations fongiques dans le lait par rapport aux populations bactériennes, l'analyse des communautés fongiques par metabarcoding présentait un risque d'échec élevé. Nous avons donc privilégié le développement de cette approche sur les fromages dans le cadre du dispositif 2. Pour l'analyse de la communauté bactérienne, les mêmes paramètres ont été appliqués quel que soit le dispositif. Le traitement des données de séquençage des champignons a dû être optimisé.

L'extraction et la purification de l'ADN total par la méthode phénol-chloroforme ont été décrites dans l'article (page 115-116). Dans cet article concernant le dispositif 1, l'amplification PCR de la région V3-V4 du gène de l'ARNr 16S (~510 pb) et l'analyse des données du séquençage à haut-débit sur les échantillons de la peau des trayons, des laits crus et de la pâte et la croûte des fromages affinés au lait cru ont été également détaillées. Les paramètres appliqués pour l'analyse des séquences bactériennes avec le pipeline FROGS ont été résumés sur la **Figure 16**.

Pour les échantillons de laits crus et des fromages au lait cru et au lait pasteurisé (croûte des fromages à 30, 90 et 150 jours d'affinage et pâte des fromages à 150 jours d'affinage) issus du dispositif 2, la même méthode d'extraction – purification a été utilisée. Les amplicons bactériens ont été préparés par amplification de la région V3-V4 du gène de l'ARNr 16S (page 116). Pour générer les amplicons fongiques, les amorces ITS3f (5' – GCATCGATGAAGAACGCAGC – 3') et ITS4_KYO1 (5' – TCCTCCGCTTWTGWTGTC – 3') ([Bokulich and Mills, 2013b](#)) ont été utilisées pour cibler la région ITS2 (~350 pb). La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume final de 50 µL contenant 10

μM de dNTPs, 20 μM de chaque amorce, 10X de tampon avec MgCl_2 et 5U de Taq DNA polymérase, et le programme PCR suivant a été appliqué : 94°C pendant 60 s, 30 cycles de 94°C pendant 60 s, 55°C pendant 60 s, 72°C pendant 60 s, et 72°C pendant 10 min. Les produits d'amplification bactérien et fongique ont été traités et séquencés en *paired-end* de 250 pb avec un séquenceur Illumina MiSeq par l'équipe NED (UMR1388 GenPhySe, France) et la plateforme GeT-PLaGE (Toulouse, France). Les données de séquençage concernant les bactéries ont été traitées comme dans le dispositif 1 en utilisant le pipeline FROGS (**Figure 16**). Pour l'analyse des données de séquençage concernant les champignons, les différentes étapes et les paramètres appliqués à cette analyse sont présentés sur la **Figure 16**. Brièvement, les *reads* ont été assemblés en utilisant l'outil FLASH (Magoč and Salzberg, 2011). Les contigs avec un score de qualité inférieur à 20 ont été supprimés avec l'outil Sickle (Joshi and Fass, 2011), puis les contigs ont été sélectionnés sur leur longueur (entre 250 et 500 pb) avec l'outil Cutadapt (Martin, 2011). Le *clustering* a été effectué en deux étapes puisque l'outil Swarm (Mahé et al., 2014) n'est pas adapté pour gérer des séquences de différentes longueurs, l'outil cd-hit (Li and Godzik, 2006) a été préalablement utilisé. Les chimères ont été supprimées grâce à l'outil VSEARCH (Torbjørn Rognes et al., 2016). Les OTUs correspondants à des séquences ITS ont été détectés avec l'outil ITSx (Bengtsson-Palme et al., 2013). La séquence représentative de chaque OTU a été assignée sur la base de données UNITE (Kõljalg et al., 2005). Les OTUs présents dans un seul échantillon et ceux dont l'abondance relative était inférieure à 0,005% ont été éliminés.

2.7. Analyses sensorielles

Les propriétés sensorielles des fromages affinés des deux dispositifs ont été évaluées comme décrit dans la publication (page 101), excepté que les fromages affinés du dispositif 2 ont été soumis à un panel de 10 juges entraînés (UR CALITYSS, Lempdes, France). Deux sessions à 2 jours d'intervalle ont été nécessaires pour analyser les 12 fromages affinés du dispositif 2 (session 1 pour les 6 fromages au lait cru et session 2 pour les 6 fromages au lait pasteurisé).

2.8. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques réalisées sur les données associées au dispositif 1 sont présentées dans la publication (page 101) et l'article (page 117).

Les analyses statistiques des données issues du dispositif 2 ont été réalisées avec R sur Windows (version 3.3.1). L'effet de la matière grasse laitière (F) sur les paramètres analysés dans le lait (composition physico-chimique, composition en acides gras, niveau de principaux groupes microbiens), dans la croûte des fromages affinés (composition en acides gras, niveau de principaux groupes microbiens) ainsi que la composition physico-chimique des fromages affinés, la composition

en AGV et en composés volatils a été analysé en utilisant le test t de Student. Lorsque l'homogénéité des variances n'était pas respectée, le test t de Welch a été utilisé. La composition en acides gras, le niveau des principaux groupes microbiens et la protéolyse dans la pâte des fromages ont été analysés à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) à mesures répétées avec le temps d'affinage (T) comme facteur répété. Pour ces données, la matière grasse (F) est utilisée comme un facteur fixe et l'interaction matière grasse x temps d'affinage (F*T) a aussi été testée. Les données sensorielles ont été analysées en utilisant un modèle mixte où la matière grasse (F) était le facteur fixe et les juges étaient les facteurs aléatoires. Le seuil de signification a été considéré à partir de 5%, et les tendances à partir de 10%. Lorsque $P > 0,10$, l'effet était considéré comme non significatif.

Les indices de diversité de Shannon (Shannon, 1948) et de Simpson (Simpson, 1949), l'estimateur Chao1 de la richesse (Chao, 1984) ont été calculés à la fois pour la communauté bactérienne et la communauté fongique sur les données non normalisées. L'effet de la matière a été analysé sur ces données en utilisant le test de Student. Les données ont été normalisées (bactérie : 39 000 séquences/échantillon ; champignon : 30 000 séquences/échantillon) et une transformation CLR (*Centered Log Ratio*) a été appliquée avant de réaliser une analyse multivariée, la PLS-DA (*Partial Least Square discriminant analysis*), avec le package MixOmics (Lê Cao et al., 2016). La PLS-DA a été réalisée sur l'abondance relative des OTUs bactériens et fongiques issus des fromages afin de discriminer les OTUs selon la matière grasse. Les diagrammes de Venn ont été générés en utilisant Jvenn (Bardou et al., 2014).

Résultats

Article 1 : The effects of low-input grazing systems and milk pasteurisation on the chemical composition, microbial communities, and sensory properties of uncooked pressed cheeses

La première publication visait à étudier les effets conjoints des composantes biochimique et microbiologique du lait sur les caractéristiques sensorielles des fromages de type Cantal. Nous avons évalué les effets combinés des systèmes de production laitiers au pâturage et de la pasteurisation du lait sur la composition biochimique (dont celle en acides gras) et sur le niveau des principaux groupes microbiens des laits et des fromages, et sur les caractéristiques sensorielles des fromages.

Les résultats sont présentés dans l'article suivant : Frétin et al. (2017). The effects of low-input grazing systems and milk pasteurisation on the chemical composition, microbial communities, and sensory properties of uncooked pressed cheeses. International Dairy Journal, 64, 56-67.



Contents lists available at ScienceDirect

International Dairy Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/idaairy

The effects of low-input grazing systems and milk pasteurisation on the chemical composition, microbial communities, and sensory properties of uncooked pressed cheeses



Marie Frétin ^{a,b}, Anne Ferlay ^b, Isabelle Verdier-Metz ^a, Florence Fournier ^c,
Marie-Christine Montel ^a, Anne Farruggia ^b, Céline Delbès ^{a,*}, Bruno Martin ^b

^a INRA, UR545 Fromagères, Côte de Reyne, F-15000 Aurillac, France

^b INRA, UMR1213 Herbivores, VetAgro Sup, F-63122 Saint-Genès-Champagnelle, France

^c INRA, UE1414 Herbipôle, F-63122 Saint-Genès-Champagnelle, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 June 2016

Received in revised form

7 September 2016

Accepted 13 September 2016

Available online 8 October 2016

ABSTRACT

The objective of this work was to determine whether the effects of farming systems on the cheese sensory properties are reduced when the milk used to make cheese is pasteurised. The milk of cows reared under two grazing systems (extensive and semi-extensive) was processed into raw and pasteurised milk cheeses. These grazing systems were mainly differentiable by the milk fatty acid (FA) composition and, to a lesser extent, by their levels of lactic acid bacteria, which were higher in milk from the extensive grazing system. In cheese, the different FA composition persisted and affected the texture of the cheese regardless of the milk treatment. The effects of each grazing system were indistinguishable in several cheese characteristics (proteolysis, texture, and aroma) after pasteurisation. In contrast, among pasteurised milk cheeses, those resulting from an extensive system had greyer rinds, while no difference in rind colour was observed among raw milk cheeses.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The sensory quality of cheeses depends on many factors linked to cheese-making technology and to the chemical and microbial characteristics of raw milk. Farming practices that modify the characteristics of raw milk are important to consider, especially when milk is processed after minimal treatment, as in most farmhouse and quality-labelled cheeses granted a geographical indication. Particular attention has been focused on animal feed, which varies widely according to geographic region and is therefore related to the concept of “terroir” (Coulon, Delacroix-Buchet, Martin, & Pirisi, 2004). The effects of the type of forage distributed to animals (e.g., pasture, hay, grass silage, or maize silage) on the sensory properties of cheese are well documented (Martin, Verdier-Metz, Buchin, Hurtaud, & Coulon, 2005). These effects are linked to changes in milk characteristics, and particular attention has been paid to milk fat, which is known to vary widely with different animal feeds (Chilliard et al., 2007; Collomb, Büttikofer, Siber, Jeangros,

& Bosset, 2002; Elgersma, Tamminga, & Ellen, 2006; Gómez-Cortés et al., 2009).

Grazing cows produce milk with a higher proportion of unsaturated fatty acids (FAs) and a lower melting point, which results in creamier cheeses, than that of cows receiving winter diets (Martin et al., 2005). The higher concentration of carotenoids in milk fat from grazing cows also explains the yellower colour of cheeses produced from this milk than those produced from the milk of cows fed hay-, grain- or maize silage-based diets (Martin et al., 2005; Nozière et al., 2006). The role of milk fat in the formation of volatile compounds by lipolysis and the oxidation of unsaturated FA has been proposed as a possible explanation for the more intense and diversified aromas of cheeses from grazing cows in comparison with those from cows fed winter diets (Bovolenta et al., 2014; Coppa et al., 2011a). On the pasture, grassland characteristics (phenological stage and botanical composition) and the supplementation of grazed grass with additional forages and concentrates modify the FA composition of milk (Bargo, Delahoy, Schroeder, & Muller, 2006; Coppa et al., 2015; Farruggia et al., 2014). The FA composition of milk has also been proposed to explain variations in the sensory properties of cheese attributed to grazing systems

* Corresponding author. Tel.: +33 4 71 45 64 19.

E-mail address: celine.delbes@clermont.inra.fr (C. Delbès).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairy.2016.09.007>

0958-6946/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

(Coppa et al., 2011a) or to the botanical composition of pastures (Coulon et al., 2004).

Milk microbiota has received little attention when explaining the influence of animal feeding on the sensory properties of cheese, although a great deal of research has been conducted on raw milk cheeses. In unpasteurised cheese production, the raw milk microbiota plays a key role on the cheese flavour development; for instance, experimental Salers-type cheeses manufactured from the same pasteurised milk and inoculated alternately with three different microbiota differed widely in their sensory attributes (Callon, Berdagué, Dufour, & Montel, 2005). The raw milk microbiota depends mainly on the microbiota composition of sources directly in contact with the milk, such as the cow's teat skin and dairy equipment (milking machines, milk lines, and tanks), and on indirect sources such as animal feeding and bedding, drinking and washing water, stable and milking parlour air, and the milker (Montel et al., 2014). Verdier-Metz et al. (2002) showed that the microbiota of teat skin varied according to animal feeding. Consequently, the raw milk microbiota could be modified, which may explain the influence of animal feeding on the sensory properties of cheeses. This hypothesis is reinforced because some observations suggest that the effects of animal feeding on the sensory properties of cheese are reduced when milk is pasteurised (Verdier-Metz et al., 2002). Indeed, the reduction of the microbial diversity and of the associated microbial activities in milk after undergoing thermal treatment is known to affect cheese flavour (Irlinger & Mounier, 2009).

Animal feeding in general, and grass grazing in particular, could influence milk microbiota, and we can hypothesise that these changes, associated with changes in milk composition, and especially with FA composition, could modify the sensory characteristics of cheeses. Based on the literature, milk pasteurisation may hide the putative differences between grazing systems due to an equalisation of milk microbiota level (Giaccone et al., 2016; Verdier-Metz et al., 2002). To test these hypotheses, we implemented an experiment using two herds reared separately for two years under two grazing systems. We evaluated the combined effect of grazing systems and milk pasteurisation on (i) chemical composition, including FA, (ii) levels of microbial groups in milks and cheeses, and (iii) the sensory properties of cheese.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

The experiment was conducted at the experimental farm of Marcenat (INRA, UE1296 Monts d'Auvergne, France), which is located in an upland mountainous grassland area in central France (45°18'21" N, 2°50'13" E, altitude 1135–1215 m, annual rainfall 1100 mm). The study was conducted in 2012 during the 2nd year of a long-term research project assessing the interactions between management practices and animal performances at the farm level (Pires et al., 2015). A total of 24 Holstein and 24 Montbeliarde spring-calving dairy cows and their corresponding heifers were divided between two independent farmlets denominated extensive (EXT) and semi-extensive (SEMI). The EXT system consisted of 60.5 ha of highly diversified grasslands (61.1 species per paddock on average). The paddocks were grazed using a long rotational duration (4 grazing cycles of 51 days on average) managed at a low stocking rate (0.66 livestock unit (LU) ha⁻¹; LU = 600 kg of body weight). No concentrate was added to the diet of cows. The SEMI system was composed of 29.2 ha of permanent and old temporary grasslands (>10 years; 38.6 species per paddock on average). The paddocks were grazed using a rapid rotational duration (5 grazing cycles of 41 days on average) exploited at a moderate stocking rate

(1.09 LU ha⁻¹). Four kilogrammes per cow of a pelleted concentrate composed of 40% wheat, 30% barley, 25% maize, and 5% molasses were distributed daily to the SEMI cows in a collective feed trough, after the morning milking during the entire grazing period. The botanical composition of the two grazing systems is summarised in Supplementary Table S1.

Two periods (P) of three dates each of bulk milk sampling and cheese-making were chosen to examine the effects of the two grazing systems at different phenological stages of grass and different growth cycles: three dates in July 2012 (the 5th, 10th, and 12th) corresponding to peak flowering in the EXT paddock, and three dates in September 2012 (the 6th, 11th, and 13th) when the flowering period had ended.

The milk used for cheese-making was produced by a total of 15 and 17 spring-calving cows selected from among the 24 cows grazed under the EXT and SEMI systems, respectively, so that the breed, parity and lactation stage of the EXT and SEMI animals were as similar as possible. The allotment of the dairy cows is given in Supplementary Table S1. The animals were milked with the same milking machine at 6:30 am and 4:30 pm. All cows received a sterile 85% glycerol solution post-dipped on the teats following each milking. Animal and paddock characteristics are presented in Supplementary Table S1.

2.2. Cheese-making

For each cheese-making date and for each grazing system, the bulk morning milk was pooled with the previous evening's milk and stored at 4 °C. Half of this milk was pasteurised (72 °C for 20 s; PierreRalisi, Italy) prior to cheese-making. During each cheese-making date, four small-size Cantal-type cheeses (10 kg) were manufactured concomitantly from 110 L of EXT or SEMI raw (R) or pasteurised (PA) full-fat milk in separate vats. Cheese-making was performed as described previously by Martin, Pomiès, Pradel, Verdier-Metz, and Rémond (2009), except that whole milk heated to 33 °C was inoculated with 0.05 g 100 kg⁻¹ of a mesophilic starter culture (Flora Danica Direct, Chr. Hansen, Arpajon, France, consisting of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris*, *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, and *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*) and a ripening starter (1.3 mL of Monilev consisting of *Debaryomyces hansenii* and *Sporendonema casei*, and 1.3 mL of Penbac consisting of *Brachybacterium tyrofermentans*, *Brevibacterium linens*, and *Penicillium fuscoglaucum*, Laboratoire Interprofessionnel de Production (LIP), Aurillac, France) was inoculated on hessian cloths at the stage of moulding. Technological parameters (milk pH, visually assessed rennet clotting time, curd pH, and DM content) were monitored during each cheese-making assay. Overall, 24 cheeses were produced (2 grazing systems × 2 treatments of milk × 2 periods × 3 cheese-making dates). The cheeses were ripened for 20 weeks at 10 °C and 95% minimum relative humidity and then sampled for analyses.

2.3. Chemical analyses

2.3.1. Milk

Samples from vat milk used for cheese-making were collected just before the addition of rennet and starter. Immediately, milk pH was determined at 20 °C using an Ingold needle (Ingold France, Paris, France). Fat, protein and lactose contents were measured (LIAL, Aurillac, France) by infrared spectrometry (Milkoscan 4000, Foss System, Hillerød, Denmark) and, in the same samples, somatic cells (SCC) were automatically counted (Fossomatic 5000, Foss System). The free fatty acid (FFA) content was measured by the copper soap method (Jellema et al., 1991) on fresh samples. Sub-samples of milk were stored at -20 °C until analysis of lipoprotein

lipase (LPL) activity and FA composition. The milk LPL activity was measured using an artificial emulsion containing ^3H triolein emulsion (Faulconnier, Thévenet, Fléchet, & Chillard, 1994). Fatty acid methyl esters in 100 mg samples of lyophilised milk were prepared by direct methylation according to Lerch et al. (2015).

2.3.2. Cheese

After ripening, cheeses were cut and divided into triangular pieces of approximately $7 \times 12 \times 3.5$ cm for chemical analyses. Those sub-samples were packed under vacuum in aluminium foil and kept in a plastic bag to preserve antioxidants from oxidation by oxygen or light. Cheese core pH, dry matter (DM) content, and colour were determined as described by Verdier-Metz et al. (2000); fat, calcium, and phosphorus contents were determined as described by Lucas et al. (2006) (Galilait, Theix, France), and total nitrogen (N), water-soluble nitrogen (WSN), and phosphotungstic acid-soluble nitrogen (PTSN) were measured using the methods described by Ardö (1999). The rheological method used was uniaxial compression at a constant displacement rate, as described by Lerch et al. (2015). Resistance to penetration at 10%, 30%, and 50% of the height of the cheese core piece was recorded on five points uniformly distributed over the surface of the test sample. Cheese core and rind samples intended for an FA analysis were stored at -20°C . The FA compositions of cheese core and rind were determined in 100 mg samples of lyophilised and ground cheeses as described by Lerch et al. (2015), with one modification compared with milk: methanol/HCl (95:5, v/v) was substituted for methanol/boron trifluoride (95:5, v/v). Volatile fatty acids (VFA) were solvent extracted and saponified from 15 g of cheese core, then separated and quantified by gas chromatography coupled to a Flame Ionization Detector (FID) detector (Trace GC Ultra, Thermo Scientific, Gometz le Châtel, France) as described by Bugaud, Buchin, Hauwuy, and Coulon (2001).

2.4. Microbial analyses

Milk and cheese samples were stored at -20°C until an analysis was performed. Ten grams of ripened cheese rind or core samples were suspended in 90 mL phosphate buffer pH 7.5 (Gomri, 1946). Milk and cheese samples were homogenised for 2 min (milk) or 4 min (cheese) in a Stomacher Laboratory Blender (Interscience, St. Nom la Breteche, France). This suspension was used for all microbial analyses and appropriate dilutions were plated on the following media (two replicates per sample): heterofermentative facultative *Lactobacillus* were enumerated on Facultative Heterofermentative (FH) agar medium (Isolini, Grand, & Glättli, 1990) incubated at 30°C for 3 days under anaerobic conditions (Anaerocult A, VWR International, Fontenay-sous-Bois, France), total mesophilic bacteria on Plate Count Agar with Milk (PCAM) medium (IDF, 1990) with milk, Gram-negative bacteria on Plate Count Agar with Inhibitors (PCAI) medium with crystal violet (1%) and vancomycin (0.5%) as inhibitors of the Gram-positive bacteria, lactic acid bacteria on Man Rogosa Sharpe (MRS) (De Man, Rogosa, & Sharpe, 1960), and dextran-producing *Leuconostoc* on Mayeux Sandine Elliker (MSE) (Mayeux, Sandine, & Elliker, 1962) agar medium at 30°C for 3 days, yeasts and moulds on Oxytetracycline Glucose Agar (OGA) (Mossel, Visser, & Mergerink, 1962) at 25°C for 3 days, *Enterococcus* on Slanetz Bartley (SB) agar medium (Slanetz & Bartley, 1957) at 42°C for 48 h, *Enterobacteriaceae* on Violet Red Bile Glucose (VRBG) agar at 42°C for 24 h (Mossel, Mengerink, & Scholts, 1962), Gram-positive catalase-positive bacteria on Cheese Ripening Bacteria Medium (CRBM) agar (Denis, Gueguen, Henry, & Levert, 2001) at 25°C for 5 days in the dark then for 5 days under daylight. Ready-to-use media were purchased from Biokar Diagnostics (Biokar Diagnostics, Beauvais, France).

2.5. Sensory analyses

The sensory properties of the cheeses were assessed by a panel of 11 expert assessors who performed routine sensory analyses of Cantal-type cheeses (ENILV, Aurillac, France). The selection and training of the panellists were performed as described by Martin et al. (2009). During testing, the panellists gave an intensity score of between 0 and 10 for 35 attributes (4 for rind cheese appearance, 3 for core cheese appearance, 2 for touch texture, 3 for mouth texture, 9 for odour, 9 for aroma, and 5 for taste). A score of 0 for a given attribute was defined as not perceptible, while a score of 10 was defined as maximal expression of the attribute in a Cantal-type cheese. During one session, each of the 4 cheeses made on the same day were coded with 3-digit random numbers and presented at 20°C to the panellists in a varying order using a monadic sequential method. In all, 6 sessions were necessary to analyse all the cheeses (three sessions on December 2012 for July 2012 cheeses, and three on February 2013 for September 2012 cheeses).

2.6. Statistical analyses

Statistical analyses were performed with R for Windows (version 3.1.0). Milk data were analysed by a multi-way analysis of variance (ANOVA), including variables corresponding to the grazing system used (S), the period of cheese-making (P), and their interactions as fixed factors. Cheese were analysed by ANOVA where variables corresponding to the grazing system used (S), the period (P), the treatment of milk (T), and their interactions were the fixed factors. Sensory data were analysed using a mixed model where the grazing system, the period, the treatment of milk, and their interactions were the fixed factors, and the assessor was the random factor. Significance was declared at $P < 0.05$. P values between 0.05 and 0.10 were considered a tendency, while $P > 0.10$ was considered not significant. When interactions were not significant, P values were not reported. If significant differences were found by an ANOVA or a mixed-model analysis, the Benjamini–Hochberg method was used to compare differences between multiple groups. A principal component analysis (PCA) was performed on biochemical and microbial data using cheese parameters with significant differences among grazing systems, period, and milk treatment in the ANOVA as active variables and the highest discriminant sensorial attributes as non-active variables.

3. Results

3.1. Milk biochemical characteristics and microbial composition

Results for milk composition are given in Table 1. For every studied period of cheese-making, the milk fat content and the fat to protein ratio were significantly higher in EXT than in SEMI milks ($P < 0.001$). The SEMI milks had higher pH and SCC values than EXT milks.

The FFA content of milk was not affected by the grazing system, contrary to the FA profiles. The EXT milks were higher in C18:0 ($+4.1 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, $P < 0.001$), cis9-C18:1 ($+5.4 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, $P < 0.01$), long-chain saturated FA (C20:0 + C22:0 + C24:0; $+0.16 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, $P < 0.001$), cis monounsaturated FA (cis-MUFA; $+5.0 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, $P < 0.01$), and lower in short- and medium-chain FA (C6:0 + C8:0 + C10:0 and C12:0 + C14:0; -1.31 and $-3.35 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, respectively), C16:0 ($-3.25 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, $P < 0.01$), trans11-C18:1 ($-1.07 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, $P < 0.01$), trans-MUFA ($-1.31 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, $P < 0.01$), and poly-unsaturated FA (PUFA; $-0.48 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, $P < 0.05$) than SEMI milks. The cis9-C18:1 to C16:0 ratio was significantly higher ($P < 0.001$) in EXT than SEMI milks. The fatty acid composition of milks is detailed in Supplementary Table S2. Regarding microbial

Table 1
Effects of grazing system and period of cheese-making on bulk milk gross composition, fatty acid concentrations and the level of the major microbial groups.^a

Item	July		September		SEM	Effects and significance		
	EXT	SEMI	EXT	SEMI		S	P	S*P
Milk pH	6.71	6.73	6.70	6.72	0.003	**	ns	ns
Fat content (g kg ⁻¹)	40.1	34.4	42.1	37.3	0.910	***	**	ns
Protein content (g kg ⁻¹)	29.1 ^b	29.8 ^b	29.9 ^b	32.9 ^a	0.466	***	***	**
Fat/protein ratio	1.37	1.17	1.37	1.10	0.038	***	ns	ns
Lactose content (g kg ⁻¹)	50.3 ^a	49.3 ^a	47.8 ^b	49.2 ^{ab}	0.317	ns	*	*
SCC (10 ³ cfu mL ⁻¹)	184	262	213	365	23.80	**	*	ns
FFA (mEq 100 g ⁻¹ of fat)	0.19	0.20	0.37	0.29	0.068	ns	ns	ns
LPL activity (nmol min ⁻¹ mL ⁻¹)	634	643	641	596	13.41	ns	ns	ns
FA (g 100 g ⁻¹ of FA)								
C4:0	3.29	3.02	3.17	3.10	0.045	*	ns	ns
C6:0 + C8:0 + C10:0	4.72	6.34	4.65	5.65	0.248	**	ns	ns
C12:0 + C14:0	10.9	14.7	11.8	14.7	0.583	***	ns	ns
C16:0	24.3	26.4	24.7	29.1	0.654	**	*	ns
C18:0	13.2	9.42	12.5	8.08	0.687	***	ns	ns
C20:0 + C22:0 + C24:0	0.30	0.18	0.36	0.17	0.026	***	ns	ns
cis9-C18:1	24.9	19.8	23.5	17.8	0.997	**	ns	ns
Σ other cis-C18:1	1.17	1.07	1.06	0.86	0.037	**	**	ns
trans11-C18:1	2.60	3.25	2.33	3.82	0.215	**	ns	ns
Σ other trans-C18:1	4.06	5.04	3.77	5.41	0.265	*	ns	ns
C18:3 n-3	0.86	0.77	0.94	0.66	0.033	***	ns	**
Σ CLA	1.10 ^b	1.45 ^b	1.14 ^b	2.26 ^a	0.152	***	*	*
Σ n-3 LCPUFA	1.11 ^b	0.99 ^b	1.24 ^a	0.91 ^d	0.038	***	ns	**
Σ n-6 LCPUFA	1.45 ^a	1.49 ^a	1.38 ^a	1.20 ^b	0.037	ns	**	*
Σ SFA ⁷	60.9	64.3	62.0	65.0	0.675	*	ns	ns
Σ cis-MUFA	29.0	24.2	27.7	22.5	0.939	**	ns	ns
Σ trans-MUFA	5.06	6.00	4.79	6.47	0.268	**	ns	ns
Σ PUFA	4.16	4.51	4.33	4.94	0.117	*	ns	ns
cis9-C18:1/C16:0	1.03	0.75	0.95	0.62	0.054	***	ns	ns
Presumed microbial group (log cfu mL ⁻¹)								
Total mesophilic bacteria	3.22	2.96	3.46	3.11	0.070	*	*	ns
Lactic acid bacteria	3.16	2.76	3.31	3.00	0.089	*	ns	ns
Heterofermentative facultative <i>Lactobacillus</i>	2.83	2.32	2.95	2.60	0.097	*	ns	ns
Dextran-producing <i>Leuconostoc</i>	1.71	1.54	0.40	0.52	0.232	ns	*	ns
Gram-positive catalase-positive bacteria	1.97	1.75	1.53	1.53	0.096	ns	ns	ns
Gram-negative bacteria	2.06	1.93	1.43	1.49	0.221	ns	ns	ns
<i>Enterococcus</i>	0.60	0.45	0.73	0.94	0.141	ns	ns	ns
Yeast	1.42	1.30	1.38	1.02	0.138	ns	ns	ns
Mould	0.77	0.48	0.91	0.92	0.092	ns	ns	ns

^a Values reported are the mean from triplicate milk samples (n = 3); values with different superscript letters differ at P < 0.05 by statistical Benjamini–Hochberg test (• P < 0.10; * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; ns, not significant). The detailed description of the sums of fatty acids are reported in the supplementary information. Abbreviations are: EXT, extensive grazing system; SEMI, semi-intensive grazing system; S, grazing system; P, period; SCC, somatic cell counts; FA, fatty acids; FFA, free FA; CLA, conjugated linoleic acid; SFA, saturated FA; PUFA, poly-unsaturated FA; LCPUFA, long-chain PUFA; MUFA, mono-unsaturated FA; SEM, standard error of the mean.

levels, three interrelated microbial groups were affected ($P < 0.05$) by the grazing system regardless of the period studied. The levels of total mesophilic bacteria, lactic acid bacteria, and heterofermentative facultative *Lactobacillus* were higher in EXT than in SEMI milks (+0.31, +0.36 and +0.43 log cfu mL⁻¹, respectively).

With regard to the period, the milk fat content and SCC increased from July to September. The period had a limited effect on milk FA composition and microbial levels regardless of the grazing system used. The concentration of cis-C18:1 other than oleic acid and the level of dextran-producing *Leuconostoc* decreased from July to September. In September, milk protein and lactose contents were higher in SEMI milks than in EXT milks (+3.0 and 1.4 g kg⁻¹, respectively) while no difference was observed in milks from July. The proportion of n-3 FA was higher in EXT than in SEMI milks. This difference was greater in September (+0.33 g 100 g⁻¹). During this period, SEMI milks had a higher proportion of conjugated linoleic acids (CLA) but a lower proportion of n-6 PUFA than EXT milks.

3.2. Cheese chemical characteristics and microbial composition

The rennet clotting time was lower for EXT than SEMI milks (−2 min 58 s, $P < 0.001$; Supplementary Table S3). The acidification

of the curd was similar, but the draining was faster in EXT than SEMI cheeses, resulting in a significantly higher DM content in EXT cheeses placed in the cellar ($P < 0.001$). Milk pasteurisation resulted in slightly reduced curd draining, while R and PA cheeses placed in the cellar had similar pH values. From July to September, the rennet clotting time decreased (−1 min 26 s, $P < 0.05$) and curd draining was slower, even if the cheeses placed in the cellar had similar pH and dry matter content (DM) values.

For every grazing system and period of cheese-making tested, the fat in DM content was significantly higher in R than in PA cheeses (+1.68%, $P < 0.001$; Table 2). R cheeses had higher pH values than PA cheese ($P < 0.001$). The maximal deformation strength was lower for R than for PA cheeses (−82 N cm⁻², $P < 0.001$). The R cheeses were brighter than the PA cheeses ($P < 0.01$). The milk treatment did not affect the total FA profile of the cheeses, but it significantly reduced the concentration of the major VFA released through lipolysis (Table 3). In cheese rind, the levels of most microbial groups were lower in PA than in R cheeses (Table 4). However, the levels of Gram-positive catalase-positive bacteria tended to be higher in PA cheese rinds. In cheese cores, the levels of Gram-positive catalase-positive bacteria and of *Enterobacteriaceae* were slightly lower ($P < 0.05$) in PA than in R cheeses. Furthermore, primary (WSN/N) and secondary (PTSN/N)

Table 2Effects of grazing system, period and treatment of milk on cheese gross composition, proteolysis, rheology, and colour.^a

Parameters	Raw				Pasteurised				SEM	Effects and significance				
	July		September		July		September			S	T	S*T	P	P*T
	EXT	SEMI	EXT	SEMI	EXT	SEMI	EXT	SEMI						
DM (%)	63.6 ^{abc}	63.6 ^{abc}	65.0 ^a	62.8 ^a	63.6 ^{abc}	64.4 ^{ab}	63.4 ^{bc}	63.8 ^{abc}	0.199	ns	ns	*	ns	ns
Fat (%)	35.4 ^{ab}	32.4 ^{ab}	36.1 ^a	31.8 ^a	34.3 ^{bc}	32.2 ^{ab}	33.5 ^{cd}	31.5 ^a	0.360	***	**	*	ns	ns
Fat in DM (%)	55.7	51.0	55.5	50.7	54.0	50.0	52.8	49.4	0.506	***	***	ns	ns	ns
pH	5.56	5.60	5.67	5.57	5.36	5.47	5.44	5.42	0.025	ns	***	ns	ns	ns
Calcium (%)	0.66	0.76	0.67	0.76	0.69	0.74	0.72	0.73	0.011	**	ns	*	ns	ns
Phosphorus (%)	0.46	0.53	0.47	0.53	0.47	0.53	0.48	0.51	0.008	***	ns	ns	ns	ns
Proteolysis														
WSN/N (%)	26.6 ^a	23.0 ^b	21.3 ^{bc}	19.8 ^c	20.1 ^c	20.8 ^{bc}	20.9 ^{bc}	21.0 ^{bc}	0.510	ns	**	*	*	**
PTSN/WSN (%)	17.7	15.7	16.2	15.1	12.6	11.2	13.4	12.4	0.528	*	***	ns	ns	ns
PTSN/N (%)	4.70 ^a	3.60 ^b	3.42 ^{bc}	2.99 ^{cd}	2.55 ^{de}	2.33 ^e	2.79 ^{de}	2.61 ^{de}	0.163	**	***	*	*	**
Rheology														
Strength to 10% of deformation (N cm ⁻²)	1.41	1.48	1.28	1.53	1.71	1.92	1.70	1.97	0.071	ns	**	ns	ns	ns
Strength to 30% of deformation (N cm ⁻²)	3.59	4.27	3.40	3.83	5.38	5.88	4.88	5.60	0.218	*	***	ns	ns	ns
Strength to 50% of deformation (N cm ⁻²)	5.36	6.43	5.11	6.17	8.14	9.46	7.56	8.71	0.393	**	***	ns	ns	ns
Strength to max deformation (N cm ⁻²)	206	250	209	259	290	353	276	332	11.50	***	***	ns	ns	ns
Colour (cheese core)														
L* (black–white)	76.9	75.3	78.4	78.7	75.9	74.6	78.1	77.6	0.315	**	**	ns	***	ns
a* (green–red)	1.76	2.18	1.90	2.08	1.90	1.98	1.91	2.09	0.039	**	ns	ns	ns	ns
b* (blue–yellow)	20.0 ^{bc}	21.1 ^a	19.6 ^c	20.4 ^{ab}	20.5 ^{ab}	21.0 ^a	21.0 ^a	20.9 ^a	0.124	**	**	*	ns	*

^a Values reported are the mean from triplicate cheese samples (n = 3); values with different superscript letters differ at P < 0.05 by statistical Benjamini–Hochberg test (* P < 0.10; ** P < 0.05; *** P < 0.01; **** P < 0.001; ns, not significant). The non-significant interaction (S*P) is not reported in the table. Abbreviations are: EXT, extensive grazing system; SEMI, semi-intensive grazing system; S, grazing system; T, treatment of milk; P, period; DM, dry matter; N, nitrogen; WSN, water-soluble nitrogen; PTSN, phosphotungstic acid soluble nitrogen; SEM, standard error of the means.

Table 3Effects of grazing system, period of cheese-making and treatment of milk on concentrations of fatty acids and volatile fatty acids in cheeses.^a

Fatty acids (g 100 g ⁻¹ of FA)	Raw				Pasteurised				SEM	Effects and significance			
	July		September		July		September			S	T	P	S*P
	EXT	SEMI	EXT	SEMI	EXT	SEMI	EXT	SEMI					
C4:0	3.77	3.42	3.35	3.56	3.68	3.60	3.32	3.41	0.051	ns	ns	*	*
C6:0 + C8:0 + C10:0	4.91	6.35	4.61	6.01	4.85	6.54	4.68	5.78	0.178	***	ns	*	ns
C12:0 + C14:0	10.9	14.7	11.7	14.9	11.0	14.5	11.8	14.8	0.393	***	ns	ns	ns
C16:0	24.0 ^c	26.2 ^b	24.5 ^{bc}	28.7 ^a	23.9 ^c	25.8 ^{bc}	24.5 ^{bc}	28.9 ^a	0.444	***	ns	**	*
C18:0	13.2	9.45	12.5	7.98	13.0	9.38	12.4	7.99	0.468	***	ns	*	ns
C20:0 + C22:0 + C24:0	0.31 ^b	0.20 ^c	0.38 ^a	0.16 ^c	0.31 ^b	0.19 ^c	0.38 ^{ab}	0.17 ^c	0.019	***	ns	ns	*
cis9-C18:1	24.6	19.5	23.2	17.4	25.0	19.8	23.2	17.6	0.680	***	ns	*	ns
Σ cis-C18:1 isomers	1.50 ^a	1.40 ^{ab}	1.40 ^{ab}	1.11 ^c	1.48 ^{ab}	1.39 ^b	1.41 ^{ab}	1.13 ^c	0.031	***	ns	***	**
trans11-C18:1	2.61	3.34	2.37	3.82	2.62	3.33	2.45	3.85	0.149	***	ns	ns	ns
Σ trans-C18:1 isomers	3.64	4.61	3.44	5.09	3.57	4.63	3.52	5.14	0.180	***	ns	ns	ns
C18:3 n-3	0.88	0.78	0.95	0.65	0.89	0.80	0.94	0.66	0.024	***	ns	*	***
Σ CLA	1.06 ^b	1.44 ^b	1.13 ^b	2.15 ^a	1.06 ^b	1.45 ^b	1.19 ^b	2.21 ^a	0.099	***	ns	***	**
Σ n-3 LCPUFA	1.15 ^b	1.03 ^c	1.26 ^a	0.89 ^d	1.15 ^b	1.05 ^c	1.26 ^a	0.90 ^d	0.029	***	ns	ns	***
Σ n-6 LCPUFA	1.47 ^a	1.52 ^a	1.43 ^a	1.16 ^b	1.48 ^a	1.53 ^a	1.44 ^a	1.20 ^b	0.031	**	ns	***	***
Σ SFA	61.3	64.6	62.1	65.6	60.9	64.2	62.0	65.3	0.454	***	ns	ns	ns
Σ cis-MUFA	28.7	23.9	27.5	22.1	29.1	24.2	27.5	22.3	0.637	***	ns	*	ns
Σ trans-MUFA	4.95	5.89	4.81	6.40	4.88	5.90	4.88	6.44	0.179	***	ns	ns	ns
Σ PUFA	4.19	4.62	4.42	4.77	4.20	4.67	4.49	4.88	0.072	**	ns	*	ns
cis9-C18:1/C16:0	1.02	0.75	0.95	0.61	1.04	0.77	0.95	0.61	0.038	***	ns	**	ns
Volatile fatty acids													
Acetic acid	61.1	72.1	56.6	64.5	46.7	43.1	33.5	43.9	3.393	ns	**	ns	ns
Propionic acid	0.35	0.70	1.58	0.32	0.14	0.10	0.09	0.08	0.137	ns	*	ns	*
Isobutyric acid	0.16 ^{abc}	0.23 ^a	0.19 ^{ab}	0.08 ^{bc}	0.12 ^{bcd}	0.10 ^{abc}	0.10 ^{cd}	0.05 ^d	0.013	*	***	**	**
Butyric acid	15.7 ^b	13.8 ^{bc}	20.5 ^a	10.3 ^{cd}	9.88 ^{cd}	7.50 ^{ef}	11.4 ^{cd}	6.44 ^f	0.963	***	***	ns	**
Isovaleric acid	0.38 ^{abc}	0.42 ^{abc}	0.45 ^{ab}	0.21 ^{bc}	0.32 ^{abc}	0.50 ^a	0.36 ^{abc}	0.20 ^c	0.031	ns	ns	*	*
Isocaproic acid	0.06	0.06	0.04	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.004	ns	ns	ns	ns
Caproic acid	6.04 ^b	6.07 ^b	7.76 ^a	5.06 ^{bc}	3.94 ^{cd}	3.66 ^{cd}	4.74 ^{bc}	2.62 ^d	0.348	**	***	ns	**

^a Values reported are the mean from triplicate cheese samples (n = 3); values with different superscript letters differ at P < 0.05 by statistical Benjamini–Hochberg test (* P < 0.10; ** P < 0.05; *** P < 0.01; **** P < 0.001; ns, not significant). The non-significant interactions (P*T and S*P) are not reported in the table. The detailed description of the sums of fatty acids are reported in the supplementary information. Abbreviations are: EXT, extensive grazing system; SEMI, semi-intensive grazing system; S, grazing system; T, treatment of milk; P, period; FA, fatty acids; CLA, conjugated linoleic acid; SFA, saturated FA; PUFA, poly-unsaturated FA; LCPUFA, long-chain PUFA; MUFA, mono-unsaturated FA; SEM, standard error of the means.

Table 4

Effects of grazing system, period of cheese-making and treatment of milk on the level of the major microbial groups in rind and core of cheeses.^a

Presumed microbial group (log cfu g ⁻¹)	Raw				Pasteurised				SEM	Effects and significance				
	July		September		July		September			S	T	P	P*T	
	EXT	SEMI	EXT	SEMI	EXT	SEMI	EXT	SEMI						
Cheese rind														
Total mesophilic bacteria	9.20	9.42	9.00	9.11	9.47	9.17	9.22	9.16	0.049	ns	ns	*	ns	
Lactic acid bacteria	7.27	6.93	7.32	7.23	6.43	6.08	6.31	6.36	0.108	*	***	ns	ns	
Heterofermentative facultative <i>Lactobacillus</i>	7.24 ^a	6.82 ^a	7.34 ^a	7.04 ^a	4.92 ^a	4.52 ^a	5.98 ^b	5.99 ^b	0.223	ns	***	**	*	
Gram-positive catalase-positive bacteria	9.71	9.98	9.70	9.47	10.0	10.1	9.94	9.86	0.072	ns	*	ns	ns	
<i>Enterococcus</i>	5.45	5.20	5.33	5.07	nd	nd	1.94	1.70	0.417	ns	***	ns	*	
<i>Enterobacteriaceae</i>	2.74	2.35	2.75	2.45	nd	nd	2.15	nd	0.190	*	***	ns	ns	
Yeast	6.81	6.49	6.26	5.95	4.73	4.18	5.38	3.74	0.253	*	***	ns	ns	
Mould	6.50	6.73	6.66	6.71	6.05	6.13	5.93	6.16	0.091	ns	**	ns	ns	
Cheese core														
Total mesophilic bacteria	7.14	6.93	7.15	7.27	7.12	6.75	7.15	7.08	0.071	ns	ns	ns	ns	
Lactic acid bacteria	6.15	6.91	6.64	6.93	6.99	6.78	6.65	6.68	0.160	ns	ns	ns	ns	
Heterofermentative facultative <i>Lactobacillus</i>	7.31	6.95	7.50	7.41	7.20	6.95	7.07	6.95	0.113	ns	ns	ns	ns	
Dextran-producing <i>Leuconostoc</i>	4.30	2.99	nd	nd	1.67	1.67	nd	nd	0.336	ns	ns	*	ns	
Gram-positive catalase-positive bacteria	5.52	5.26	5.84	5.78	4.68	4.69	5.19	5.02	0.156	ns	*	ns	ns	
<i>Enterococcus</i>	5.95 ^a	5.76 ^a	5.45 ^a	4.94 ^a	nd	nd	2.76 ^b	2.08 ^{bc}	0.433	ns	***	ns	**	
<i>Enterobacteriaceae</i>	2.67	2.30	1.63	1.43	nd	nd	1.72	nd	0.178	ns	*	ns	*	
Yeast	3.54	2.67	4.06	3.83	nd	nd	3.55	3.35	0.377	ns	*	*	ns	
Mould	1.08	2.19	nd	nd	1.41	nd	nd	1.49	0.125	ns	ns	ns	ns	

^a Values reported are the mean from triplicate cheese samples (n = 3); values with different superscript letters differ at $P < 0.05$ by statistical Benjamini–Hochberg test (* $P < 0.10$; ** $P < 0.05$; *** $P < 0.01$; **** $P < 0.001$; ns, not significant). The non-significant interactions (S*P and S*T) are not reported in the table. Abbreviations are: EXT, extensive grazing system; SEMI, semi-intensive grazing system; S, grazing system; T, treatment of milk; P, period; nd, not determined (below detection threshold: 10 or 100 according to media); SEM, standard error of the means.

proteolysis was most advanced in R cheeses made in July, while no difference was observed among PA cheeses (Table 2). In September, the levels of heterofermentative facultative *Lactobacillus* on the cheese rind and of *Enterococcus* on the cheese core were higher in PA cheeses, while no difference was observed among R cheeses (Table 4).

For every milk treatment and period of cheese-making studied, the fat in DM content was significantly higher in EXT than in SEMI cheeses (+4.23%, $P < 0.001$; Table 2), and the opposite was observed for cheese calcium and phosphorus contents. The maximal deformation strength was higher for SEMI than for EXT cheeses (+53.3 N cm⁻², $P < 0.001$). The latter were also brighter and less red than SEMI cheeses ($P < 0.01$). The FA profiles of EXT and SEMI cheeses were very different, as they were for their respective milks (Table 3). The EXT cheese cores were higher in C18:0 (+4.1 g 100 g⁻¹, $P < 0.001$), cis9-C18:1 (+5.4 g 100 g⁻¹, $P < 0.001$), and cis-MUFA (+5.1 g 100 g⁻¹, $P < 0.001$), and lower in short- and medium-chain FA (-1.4 and -3.4 g 100 g⁻¹, respectively, $P < 0.001$), saturated FA (SFA; -3.4 g 100 g⁻¹, $P < 0.001$), trans11-C18:1 (-1.1 g 100 g⁻¹, $P < 0.001$), trans-MUFA (-1.3 g 100 g⁻¹, $P < 0.001$), and PUFA (-0.4 g 100 g⁻¹, $P < 0.01$) than SEMI cheese cores. The cis9-C18:1 to C16:0 ratio was significantly higher for EXT than for SEMI cheese cores ($P < 0.001$). The fatty acid composition of cheese cores is detailed in Supplementary Table S4. Similar results were obtained for cheese rinds (Supplementary Table S5). The levels of microbial groups in cheeses were weakly impacted by the grazing system used, except for yeasts (Table 4). Their levels were higher in EXT than in SEMI cheese rinds (+0.71 log cfu g⁻¹).

The interaction between the effects of the grazing system and milk pasteurisation (S*T) was significant for some cheese characteristics: the DM content of SEMI cheeses was higher in PA than in R cheeses, the DM to the DM content of EXT cheeses (Table 2). Fat content in EXT cheeses was higher in R than in PA cheeses, while no difference was observed in SEMI cheeses. The indicator of primary proteolysis (WSN/N) in R cheeses was higher in EXT cheeses than in SEMI cheeses, while it was equivalent in all PA cheeses regardless of the grazing system used. The colour of R cheeses was less yellow than that of PA cheeses, in particular for EXT cheeses.

Concerning the period of cheese-making, the gross composition of ripened cheeses made in July and September was similar regardless of the grazing system used and any milk treatment (Table 2). Cheeses made in July were less white than those made in September ($P < 0.001$). The concentrations of C18:0 (+1.1 g 100 g⁻¹), cis9-C18:1 (+1.9 g 100 g⁻¹), and cis-MUFA (+1.6 g 100 g⁻¹) were slightly higher in July than in September cheese cores ($P < 0.05$; Table 3). The level of dextran-producing *Leuconostoc* was higher in the cores of cheeses made in July, while the opposite effect was observed for yeasts ($P < 0.05$; Table 4). In September, the concentrations of C16:0 and CLA were higher in SEMI than in EXT cheese cores (Table 3). During this period, SEMI cheese cores had lower concentrations of long-chain saturated FA, n-3 FA, and n-6 FA. Moreover, in the volatile fraction, the concentrations of butyric and caproic acids were higher for EXT than for SEMI cheeses, especially in September.

3.3. Cheese sensory properties

Cantal-type cheese sensory characteristics are presented in Table 5. For every grazing system and period of cheese-making studied, most sensory attributes were modified by the milk treatment used. In R cheese rinds, the spot salience (-3.0) and quantity (-3.3) were scored lower than for PA cheeses. The R cheese cores were less yellow (-0.4, $P < 0.001$) and less veined (-0.6, $P < 0.01$) than PA cheese cores. The R cheeses were considered by the panellists to be less firm to the touch (-0.9, $P < 0.001$) and more granular in the mouth (+0.5, $P < 0.001$) than PA cheeses. The R cheeses were characterised by a more intense taste (+0.9, $P < 0.001$) with a more pronounced pungent taste (+0.7, $P < 0.001$) than PA cheeses. The R cheeses also developed more intense odours (+0.9, $P < 0.01$) characterised by the attributes "fermented cream" and "yeast", while the PA cheeses were characterised by the attributes "fresh cream" and "butter". The R cheeses also developed more persistent aromas (+0.8, $P < 0.001$) described as more "rancid" and "stable" and less "butter". The colour of R cheeses spots was slightly more ochre in September, contrary to those of PA cheeses, which were more ochre in July. Cheeses made in July from

Table 5Effects of grazing system, period of cheese-making and treatment of milk on the Cantal-type cheese sensory characteristics.^a

Item	Raw				Pasteurised				SEM	Effects and significance					
	July		September		July		September			S	T	S*T	P	P*T	
	EXT	SEMI	EXT	SEMI	EXT	SEMI	EXT	SEMI							
Appearance of cheese rind															
White-grey colour	4.5 ^{bc}	4.6 ^{bc}	4.2 ^c	4.1 ^c	6.1 ^a	5.6 ^a	6.2 ^a	5.3 ^{ab}	0.115	**	***	*	ns	ns	
Spot colour (white-ochre)	5.7 ^a	6.0 ^a	6.0 ^a	6.4 ^{bc}	7.6 ^a	7.5 ^{ab}	7.2 ^{ab}	7.4 ^{ab}	0.070	ns	***	ns	ns	*	
Spot salience	4.4	4.4	4.0	4.4	7.1	7.3	7.5	7.0	0.063	ns	***	ns	ns	ns	
Spot quantity	4.1	4.3	3.0	4.2	7.0	7.7	6.9	7.3	0.074	*	***	ns	ns	ns	
Appearance of cheese core															
White-yellow colour	5.6	6.3	5.4	5.8	6.4	6.7	5.6	6.0	0.061	*	***	ns	***	*	
Core veined	3.6	3.8	3.8	4.3	4.4	4.8	4.2	4.6	0.117	ns	**	ns	ns	ns	
Core marbled	4.6	5.2	3.5	4.0	4.6	4.5	3.4	3.7	0.110	ns	ns	ns	***	ns	
Odour															
Intense	6.3	5.7	5.5	5.6	5.2	5.0	4.9	4.6	0.093	ns	**	ns	*	ns	
Fresh cream	0.2	0.4	0.3	0.0	0.8	0.7	0.9	0.7	0.073	ns	**	ns	ns	ns	
Fermented cream	1.8	1.5	0.9	1.1	0.9	0.9	0.6	0.4	0.043	ns	**	ns	*	ns	
Butter	0.2	0.2	0.1	0.2	0.6	0.5	0.5	0.3	0.034	ns	***	ns	ns	ns	
Egg	0.2	0.1	0.3	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.027	ns	ns	ns	ns	ns	
Swiss type cheese	0.4 ^{ab}	0.3 ^c	0.6 ^{ab}	0.4 ^{ab}	0.7 ^{ab}	0.8 ^a	0.4 ^{ab}	0.5 ^{ab}	0.067	ns	*	ns	*	*	
Yeast	1.3	0.8	0.6	0.6	0.5	0.7	0.5	0.4	0.042	ns	**	ns	ns	ns	
Vanilla	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.025	ns	ns	ns	ns	ns	
Plastic	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.0	0.008	ns	ns	ns	ns	ns	
Texture															
Firm	4.6	4.9	4.9	5.0	5.8	5.7	5.5	5.9	0.066	ns	***	ns	ns	ns	
Elastic	3.8 ^d	4.5 ^c	4.9 ^{abc}	5.5 ^a	4.8 ^{bc}	5.3 ^{ab}	5.3 ^{ab}	5.0 ^{abc}	0.103	ns	***	*	ns	***	
Creamy	5.2	5.0	5.5	5.1	4.8	4.3	5.0	4.6	0.068	*	*	ns	ns	ns	
Adhesive	2.1	1.9	2.6	1.8	2.6	1.6	2.7	2.3	0.097	**	ns	ns	ns	ns	
Granular	1.7	1.4	1.1	1.0	1.0	1.0	0.5	0.9	0.054	ns	***	ns	*	ns	
Taste															
Intense	6.7	6.4	6.4	6.1	5.6	5.7	5.4	5.4	0.080	ns	***	ns	*	ns	
Salty	5.4	5.5	5.5	5.4	5.4	5.3	5.4	5.2	0.031	*	ns	ns	ns	ns	
Sour	1.7	1.8	1.8	1.7	1.6	1.2	2.0	1.4	0.088	*	ns	*	ns	ns	
Bitter	2.2	2.2	2.5	2.0	2.0	1.8	1.9	1.7	0.090	ns	ns	ns	ns	ns	
Pungent	2.3	2.2	2.2	1.5	1.5	1.2	1.4	1.2	0.078	ns	***	ns	ns	ns	
Aroma															
Fresh cream	0.1	0.0	0.1	0.1	0.2	0.1	0.3	0.1	0.024	ns	ns	ns	ns	ns	
Fermented cream	1.1 ^a	0.6 ^b	0.5 ^b	0.4 ^b	0.4 ^b	0.6 ^b	0.2 ^b	0.4 ^b	0.041	ns	***	**	ns	ns	
Butter	0.0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.2	0.1	0.017	ns	**	ns	*	*	
Swiss type cheese	0.2	0.2	0.2	0.1	0.3	0.4	0.2	0.3	0.048	ns	ns	ns	*	ns	
Mushroom	0.2	0.0	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.0	0.012	ns	ns	ns	ns	ns	
Stable	0.8	0.5	0.4	0.3	0.2	0.3	0.1	0.1	0.023	ns	***	ns	ns	ns	
Rancid	0.6	0.6	0.5	0.4	0.2	0.2	0.2	0.3	0.035	ns	***	ns	ns	ns	
Plastic	0.1 ^{ab}	0.2 ^{ab}	0.3 ^a	0.2 ^{ab}	0.2 ^{ab}	0.2 ^{ab}	0.1 ^{ab}	0.0 ^b	0.006	ns	ns	ns	*	*	
Persistent	6.3	5.9	6.2	6.0	5.5	5.0	5.4	5.4	0.085	ns	***	ns	ns	ns	

^a Values reported are the mean from triplicate cheese samples ($n = 3$); values with different superscript letters differ at $P < 0.05$ by statistical Benjamini–Hochberg test (* $P < 0.10$; ** $P < 0.05$; *** $P < 0.01$; ns, not significant). The non-significant interaction (S*P) is not reported in the table. Abbreviations are: EXT, extensive grazing system; SEMI, semi-intensive grazing system; S, grazing system; T, treatment of milk; P, period; SEM, standard error of the means.

R milks were less elastic than those made in September, while no difference was observed in PA cheeses. In July, the R cheeses had a less “Swiss type cheese” odour than PA cheeses, while no difference was observed in cheeses made in September.

A significant effect of the grazing system used was observed only for six out of thirty-five sensory attributes, regardless of the milk treatment and the period of cheese-making. The quantity of spots on the rind was slightly lower, and the cheese cores were less yellow ($P < 0.05$) for EXT than for SEMI cheese rinds. The latter were creamier ($P < 0.05$) and more adhesive ($P < 0.01$). Moreover, EXT cheeses were slightly saltier and more sour ($P < 0.05$) than SEMI cheeses. No sensory attributes related to odour and aroma were affected by the grazing system used.

The S*T interaction affected few cheese sensory properties. Among PA cheeses, the EXT cheeses had greyer rinds than the SEMI cheeses, while no difference was observed between R cheeses from the two grazing systems. The SEMI cheeses were more elastic than EXT cheeses, in particular for the R cheeses. The “fermented cream” aroma was higher for EXT cheeses than SEMI cheeses in R cheeses, while no difference was observed among PA cheeses.

Concerning the period of cheese-making, the differences between cheeses made in July and in September concerned mainly the appearance of the cheese core, regardless of the grazing system and the milk treatment used. Cheeses made in September were judged as having a whiter (+0.6, $P < 0.001$) and a more marbled core (+1.1, $P < 0.001$) than July cheeses. The latter had a more intense taste ($P < 0.05$). The period had slight effects on the sensory attributes of odour, texture, and aroma.

3.4. Relationships between sensory characteristics and the biochemical and microbial composition of Cantal-type cheeses

PCA was performed to summarise the main relationships between sensorial, biochemical and microbial data accounting for effects attributable to the grazing system, milk treatment, and period of cheese-making used (Fig. 1). The first and second principal components accounted for 62% of the total variance. Generally, the sensory variables corresponding to aroma, odour, and taste were positively correlated (Fig. 1A). These variables were also positively correlated with the levels of microbial groups,

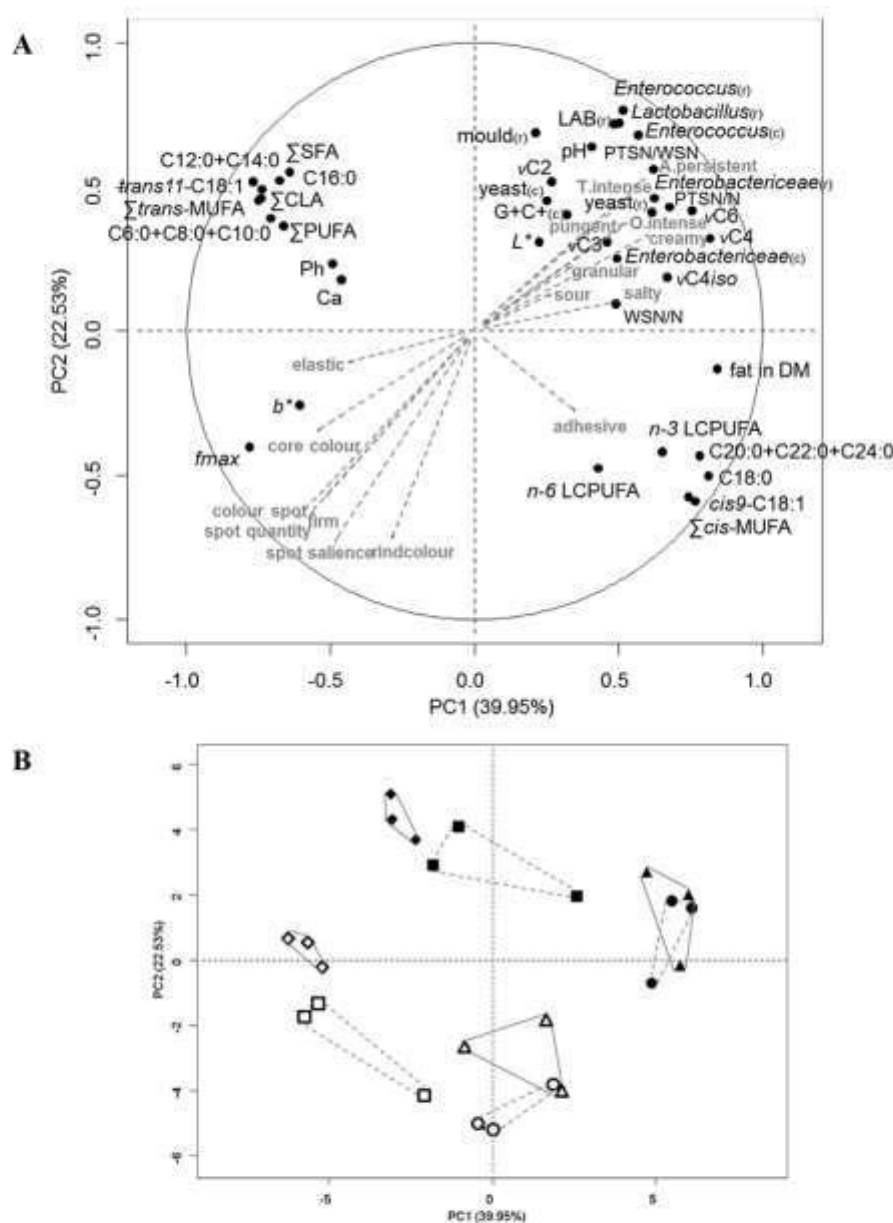


Fig. 1. Principal component analysis (PCA) performed on biochemical and microbial data significantly different for at least one of 3 factors (grazing system, period of cheese-making, treatment of milk) from 24 cheese samples. Panel A: projection of 39 active variables (●) and the 16 highest discriminant sensorial attributes used as non-active variables (—). Abbreviations are: DM, dry matter; Ca, calcium; Ph, phosphorous; N, nitrogen; WSN, water-soluble nitrogen; PTSN, phosphotungstic acid soluble nitrogen; vC2, volatile acetic acid; vC3, volatile propionic acid; vC4iso, volatile isobutyric acid; vC4, volatile butyric acid; vC6, volatile caproic acid; fmax, strength to max deformation; FA, fatty acids; CLA, conjugated linoleic acid; SFA, saturated FA; PUFA, poly-unsaturated FA; LCPUFA, long-chain PUFA; MUFA, mono-unsaturated FA; (r), cheese rind; (c), cheese core; LAB, lactic acid bacteria; G+C+, Gram-positive catalase-positive bacteria; O, odour; T, taste; A, aroma. Panel B: plot of sample distribution is projected on principal components (PC) 1 and 2 (●, EXT cheeses in July; ▲, EXT cheeses in September; ■, □, SEMI cheeses in July; ◆, ◇, SEMI cheeses in September). The closed symbols correspond to R cheeses and the open symbols to PA cheeses. The dotted line corresponds to cheeses made in July and the continuous line to cheeses made in September.

proteolysis, and VFA concentration. All these variables were negatively correlated with the sensory variables corresponding to firmness and rind appearance. No FA concentration was significantly correlated with the variables cited above. The sums of SFA, PUFA, and CLA were negatively correlated with those of LCPUFA and cis-MUFA. On the first axis, R cheeses were characterised by higher levels of microbial groups, higher VFA concentrations, and higher levels of proteolysis in relation to stronger odours and tastes and more persistent aromas than PA cheeses (Fig. 1B). PA cheeses had higher firmness and appearance estimators than R cheeses. On the second axis, EXT and SEMI cheeses were mainly differentiated by their FA profiles.

4. Discussion

4.1. Grazing systems

The originality of this study is that the same milking machine and the same facilities and conditions of cheese-making and ripening were used for both grazing systems, in contrast with most field studies, and thus grazing system is the major factor explaining potential differences in milk and cheese microbial and chemical compositions.

The main influence of grazing systems concerned cheese texture, which is known to vary according to cheese fat in DM, calcium and phosphorus contents, FA profile, and proteolysis (Fox, Law, McSweeney, & Wallace, 1999). The higher fat in DM of EXT than SEMI cheeses is concordant with their creamier and more adhesive textures and is directly linked to the higher fat to protein ratio of the corresponding milks. The grazing diet in the EXT system is characterised by no concentrate distribution. The lower energetic density and the higher fibre content of the diet in EXT systems (Supplementary Table S1) reduced the protein content of the milk produced and increased the fat content of the milk, respectively. These observations were particularly more pronounced in September, when the EXT cows grazed on mature grass. Moreover, the energy expended by cows walking was higher in the EXT system, where the grazing surface was the largest. The higher body reserve mobilisation of EXT cows may contribute to the higher cis9-C18:1 content in their milk because cis9-C18:1 is the primary FA released from body reserves during their mobilisation (Kay et al., 2005). In contrast, the greater milk yield of SEMI cows could reflect the improved nutritional status of these cows, as previously reported by Pires et al. (2015).

Cheese FA profiles may also contribute to the differences found in cheese texture according to the grazing system. The influence of FA composition on cheese texture is mainly linked to C16:0 and cis9-C18:1 concentrations, which are the major milk saturated and monounsaturated FAs and have high and low melting points, respectively. In our study, the EXT cheeses (versus SEMI cheeses) were creamier, which is in agreement with their higher cis9-C18:1 to C16:0 ratios (Martin et al., 2005). As previously reported by many authors (Bodas et al., 2010; Lucas et al., 2006), the FA profiles of cheeses reflect those of milks. The latter can be modulated by diet characteristics such as the amount of concentrate or the botanical composition of grassland pastures (Chilliard et al., 2007; Ferlay, Martin, Pradel, Coulon, & Chilliard, 2006). Our results confirm that the concentrations in milk of short- and medium-chain FA and trans-C18:1 isomers are higher in SEMI than EXT milks, and the concentrations of cis9-C18:1 and n-3 LCPUFA are lower due to the combined effects of concentrate distributed to SEMI cows (Chilliard et al., 2007) and the lower botanical diversity of grasslands (Farrugia et al., 2014). These effects could be due partly to the leafier herbage grazed in the SEMI system. When herbage matures, the concentrations of trans11-C18:1 and cis9trans11-CLA decrease

while that of C16:0 increases (Coppa et al., 2015). We can notice that in EXT milks and cheeses, the lower concentration of the major atherogenic FA (C12:0, C14:0, C16:0) combined to the higher concentration of cis9-C18:1 and C18:3n-3 can be considered as an advantage from a nutritional point of view (Bodas et al., 2010; Gómez-Cortés et al., 2009). On the contrary, the higher content of trans11-C18:1 and cis9trans11-CLA in SEMI milks and cheeses may be considered as an advantage regarding their putative role in the prevention of cancer (Shingfield, Bernard, Leroux, & Chilliard, 2010). However, the differences in milk FA profiles between the two grazing systems were limited because both diets were based essentially on grazed grass, as was previously shown by Coppa et al. (2011b).

The yellower cores of SEMI cheeses compared with EXT cheeses may be linked to a higher fat concentration of carotenoids in SEMI cheeses because these pigments are known to have a considerable effect on milk and cheese yellow colour (Nozière et al., 2006). Little or no change in the concentration of carotenoids between milks and cheeses was observed by these authors. The putative higher carotenoids concentration of SEMI milk fat is in accordance with the fact that, due to the higher stocking rate and rapid rotation among paddocks, the SEMI cows were allowed to graze herbage at leafy stage rich in carotenoids (Nozière et al., 2006), especially in September.

The cheeses from the two studied grazing systems were not clearly differentiated according to their flavours or their odours, even if EXT cheeses were slightly saltier and sourer than SEMI cheeses, in agreement with Coppa et al. (2011b). This result contrasts with studies reporting that the most diversified grasslands give intense and diversified aromas to cheeses (Coulon et al., 2004; Martin et al., 2005). Surprisingly, the cheese flavour seems unaffected by the more advanced secondary proteolysis and by the higher concentration of volatile butyric acid in EXT cheeses, which is usually associated to strong cheese flavour (Cornu et al., 2009). We can suppose that the quantitative differences of proteolysis or VFA concentrations observed between the grazing systems were too weak to be perceived by the panellists. Moreover, microbial activities play a key role in the development of cheese flavours (Montel et al., 2014). Although the levels of several microbial groups were higher in EXT than in SEMI milks, microbial levels in cheeses were weakly modified by the grazing system, except for yeast levels, which were higher in EXT cheese rinds. The same starter cultures were added to all cheeses for acidification and ripening, which may have impeded the development of the raw milk microbiota, thereby lessening the differences between grazing systems.

The high spot quantities observed in our study on SEMI cheese rinds were previously reported in Cantal-type cheeses manufactured with milks with high PUFA contents (Coppa et al., 2011b). Lerch et al. (2015) also observed differences in rind appearance in Saint-Nectaire type cheeses associated with *Mucor* (mould) development related to the FA composition of milk. Although the antimicrobial properties of FA and their derivatives have been known for many years (Kabara, Swieczkowski, Conley, & Truant, 1972), their effects on cheese surface microbiota have not been evaluated (Monnet, Landaud, Bonnarme, & Swennen, 2014). We can hypothesise that the FA profile of SEMI cheese rinds may confer an advantage to ripening starters that produce typical Cantal cheese spots, such as the mould *S. casei* (Coppa et al., 2011a), which could explain the observed differences in cheese rind appearance.

4.2. Milk treatment

The sensory properties of cheese were drastically modified by milk pasteurisation in our study. The more intense and diversified flavour of raw milk than pasteurised milk cheeses was previously

reported by many authors using similar (Buchin et al., 1998; Cornu et al., 2009) or different cheese models (Bachmann et al., 2011; Montel et al., 2014; Van Hekken, 2012). The drop in the VFA concentrations in pasteurised milk cheeses observed in our study, and more generally the differences in the balance of volatile compounds as previously reported by Buchin et al. (1998) and Demarigny, Beuvier, Buchin, Pochet, and Grappin (1997) were closely related to the low levels and diversity of microorganisms in pasteurised milks and to the associated catabolic reactions in pasteurised milk cheeses. This may contribute to their more intense and diversified flavours as found in our study. An optimum flavour is achieved faster in raw milk cheeses due to the enhanced microbial activities in these cheeses (Bachmann et al., 2011; Grappin & Beuvier, 1997). Cornu et al. (2009) suggested that softer odours such as "cream" and "fresh cream" in pasteurised milk Cantal-type cheeses would be a result of the decreased quantity of short-chain fatty acids released, which are odour-active compounds.

The more advanced proteolysis of raw milk cheeses made in July compared with pasteurised milk cheeses may explain their less elastic texture and their lower firmness as reported by Gaya, Medina, Rodríguez-Marín, and Nunez (1990). Proteolysis levels and the elasticity of pasteurised milk cheeses manufactured in July and September were similar, which confirms the negative association observed in PCA between proteolysis and cheese elasticity. Nevertheless, some authors found that proteolysis was lower in raw milk cheeses because of their lower moisture content (Grappin & Beuvier, 1997), which we did not observe in this study.

Sensory analysis highlighted higher spot quantity and salience on the rinds of pasteurised milk cheeses compared with raw milk cheeses. The same ripening starters that contribute to the development of spots on Cantal cheeses rind were inoculated on the cloths of both the raw and the pasteurised milk cheeses. However, among the microbial groups potentially involved in ripening and comprising species added as ripening starters, the levels of Gram-positive catalase-positive bacteria tended to be higher on the rinds of pasteurised milk cheeses, while the levels of yeasts and moulds were lower on the rinds of those cheeses. Although we do not know the precise levels of the ripening starter strains reached in each cheese, we can hypothesise that they grow more easily on the rinds of pasteurised cheeses because the levels of raw milk microbiota in these cheeses are reduced by pasteurisation.

In our trial, the cores of the pasteurised cheeses were considered the yellowest for every grazing system and cheese-making period studied. This effect of pasteurisation on cheese colour is infrequently mentioned in the literature, although it is a decisive factor for consumers when deciding to purchase cheeses. Despite the low temperature and the short duration of milk heating (72 °C, 20 s), we propose the hypothesis that this colouration could be linked to a non-enzymatic Maillard reaction (Van Boekel, 1998) caused by the interaction between reducing sugars and amino acids.

4.3. The combined effect of grazing system and milk treatment

Regarding cheese flavour, some authors have previously reported interactions between milk production conditions and milk heat treatment (Cornu et al., 2009). In particular, in cheeses derived from pasture or winter diets, Verdier-Metz et al. (2002) observed a higher effect of diet on cheese flavour when using raw milk than when using pasteurised milk. This suggests that this effect could be ascribed to milk components such as native enzymes from milk (e.g., LPL or plasmin) or milk microbiota that are modified by milk pasteurisation. In our study, the fermented cream aroma was more pronounced in EXT than in SEMI cheeses made from raw milk, whereas this effect was not observed with pasteurised milk cheeses. Similarly, differences in proteolysis and elasticity in raw

milk cheeses between grazing systems were observed, while all pasteurised cheeses had similar characteristics. This difference in raw milk cheeses cannot be explained by milk LPL, because LPL did not vary in milk according to the grazing systems or the period of cheese-making. Levels of lactic bacteria (lactic acid bacteria and heterofermentative facultative *Lactobacillus*) differed in milk according to the grazing systems used, which could have affected the extent and nature of amino acids released by the degradation of peptides (action of microbial proteinases and peptidases) through proteolysis, and thus their transformation to catabolic products involved in cheese flavour (Kieronczyk, Skeje, Olsen, & Langsrud, 2001; Marilley & Casey, 2004). With regard to the level of microbial groups in ripened cheeses, only few interactions with milk treatment were observed. Where there were interactions, differences between periods of cheese-making were only observed in pasteurised milk cheeses. Therefore, the interactions between milk production conditions and milk heat treatment reported previously are only partly supported by our results. One explanation could be that the grazing systems used were too similar to exert a significant effect on the sensory properties of cheese.

4.4. Period of cheese-making

The effect of the cheese-making period on the sensory properties of cheese is weak in our study because the animal diet and cheese-making facilities were similar at both periods. Our result is contradictory to other studies (Agabriel et al., 2004; Esposito et al., 2014; Giaccone et al., 2016) where this effect was noteworthy because of the combination of different elements (season, feeding, management system).

5. Conclusion

In this experiment, we aimed to test whether the effects of farming systems on the sensory properties of cheese are partly eliminated when milk is pasteurised prior to cheese-making. This hypothesis was confirmed only for proteolysis, elasticity, and fermented cream aroma of cheeses. These differences could be associated to the different levels of lactic bacteria in raw milk of EXT and SEMI systems. Nevertheless, the two grazing systems were too similar to exert a significant effect on the sensory properties of cheeses. The effect of milk pasteurisation was the greatest when compared with other factors. The grazing systems tested resulted in important differences in milk FA profile, and hence in cheese texture. We noticed differences in the levels of several microbial groups in milks that were no longer present in the associated cheeses. The addition of the same starter cultures in all cheeses may explain that the cheese flavour was faintly affected. Although the effects of grazing systems on cheese rind appearance were not explained by the levels of microbial groups in cheese, we hypothesise that the grazing systems used may induce a modification in the balance of microbial species present and their associated microbial activities. Further research integrating a metabarcoding approach (sequencing of phylogenetic biomarker amplicons) will be needed to better understand the effects of the factors tested.

Acknowledgements

Financial support for this study was provided by the Auvergne region and FEDER funds in the framework of a CPER T2ANSH 2013 project N° 2101 088 272 SyEL-inAuv (Systèmes d'Élevage laitier innovants en Auvergne). The authors wish to thank the staff of the INRA farm at Marcenat for animal care, René Lavigne for cheese-making, Béatrice Desserre for microbiological analyses, Isabelle Constant for her valuable help in the analyses, Emilie Tixier for milk

fatty acid analyses, Solange Buchin for volatile fatty acid analyses and Hélène Albouy for the sensory evaluation of the cheeses (ENILV Aurillac). The authors also thank the American Journal Experts for English proofreading.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.09.007>.

References

- Agabriel, C., Martin, B., Silva, C., Bonnefoy, J. C., Montel, M. C., Didiéne, R., et al. (2004). Effect of dairy production systems on the sensory characteristics of cantal cheeses: A plant-scale study. *Animal Research*, 53, 221–234.
- Ardó, Y. (1999). Evaluating proteolysis by analysing the N content of cheese fractions. *Bulletin-FIL-IDF*, 337, 4–9.
- Bachmann, H. P., Frohlich-Wyder, M. T., Jakob, E., Roth, E., Wechsler, D., Beuquier, E., et al. (2011). Raw milk cheeses. In J. W. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences* (2nd ed., Vol. 1, pp. 652–660). San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Bargo, F., Delaboy, J. E., Schroeder, G. F., & Muller, L. D. (2006). Milk fatty acid composition of dairy cows grazing at two pasture allowances and supplemented with different levels and sources of concentrate. *Animal Feed Science and Technology*, 125, 17–31.
- Budas, R., Mammi, T., Mantecón, A. R., Juárez, M., de la Fuente, M. A., & Gómez-Cortés, P. (2010). Comparison of the fatty acid profiles in cheeses from ewes fed diets supplemented with different plant oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10493–10502.
- Bovolenta, S., Rotmanzin, A., Corazzin, M., Spanghero, M., Agrea, E., Gasperi, F., et al. (2014). Volatile compounds and sensory properties of Montasio cheese made from the milk of Simmental cows grazing on alpine pastures. *Journal of Dairy Science*, 97, 7373–7385.
- Buchin, S., Delague, V., Duboz, G., Berdagüe, J. L., Beuquier, E., Pochet, S., et al. (1998). Influence of pasteurization and fat composition of milk on the volatile compounds and flavor characteristics of semi-hard cheese. *Journal of Dairy Science*, 81, 3097–3108.
- Bugaud, C., Buchin, S., Hanuway, A., & Coulon, J. B. (2001). Relationships between flavour and chemical composition of abundance cheese derived from different types of pastures. *Lait*, 81, 757–773.
- Callon, C., Berdagüe, J. L., Dufour, E., & Montel, M. C. (2005). The effect of raw milk microbial flora on the sensory characteristics of Salers-type cheeses. *Journal of Dairy Science*, 88, 3840–3850.
- 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, 828–855.
- Cullum, M., Büttiker, U., Siler, R., Jeangros, B., & Bossert, J. O. (2002). Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography. *International Dairy Journal*, 12, 649–659.
- Coppa, M., Ferlay, A., Borreani, G., Revello-Chion, A., Tabacco, E., Tornambé, G., et al. (2015). Effect of phenological stage and proportion of fresh forage in cow diets on milk fatty acid composition. *Animal Feed Science and Technology*, 208, 66–78.
- Coppa, M., Ferlay, A., Monsallier, F., Verdier-Metz, I., Pradel, P., Didiéne, R., et al. (2011a). Milk fatty acid composition and cheese texture and appearance from cows fed hay or different grazing systems on upland pastures. *Journal of Dairy Science*, 94, 1132–1145.
- Coppa, M., Verdier-Metz, I., Ferlay, A., Pradel, P., Didiéne, R., Farruggia, A., et al. (2011b). 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, 815–822.
- Cornu, A., Rabini, N., Kondjiny, N., Verdier-Metz, I., Pradel, P., Tournayre, P., et al. (2009). Odour-active compound profiles in Cantal-type cheese: Effect of cow diet, milk pasteurization and cheese ripening. *International Dairy Journal*, 19, 588–594.
- Coulon, J. B., Delacroix-Buchet, A., Martin, B., & Piri, A. (2004). Relationships between ruminant management and sensory characteristics of cheeses: A review. *Lait*, 84, 221–241.
- De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, E. M. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 23, 130–135.
- Demarigny, Y., Beuquier, E., Buchin, S., Pochet, S., & Grappin, R. (1997). Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses. 2. Biochemical and sensory characteristics. *Lait*, 77, 151–167.
- Denis, C., Guéguen, M., Henry, E., & Levert, D. (2001). New media for the enumeration of cheese surface bacteria. *Lait*, 81, 365–379.
- Eggersma, A., Tamminga, S., & Ellen, G. (2006). Modifying milk composition through forage. *Animal Feed Science and Technology*, 131, 207–225.
- Exposito, G., Masooci, F., Napolitano, F., Braghieri, A., Romano, R., Manzù, N., et al. (2014). Fatty acid and sensory profiles of Caciocavallo cheese as affected by management system. *Journal of Dairy Science*, 97, 918–928.
- Farruggia, A., Pomies, D., Coppa, M., Ferlay, A., Verdier-Metz, I., Le Morvan, A., et al. (2014). Animal performances, pasture biodiversity and dairy product quality: How it works in contrasted mountain grazing systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 185, 231–244.
- Faulconnier, Y., Thévenet, M., Fléchet, J., & Chilliard, Y. (1994). Lipoprotein lipase and metabolic activities in incubated bovine adipose tissue explants: Effects of insulin, dexamethasone, and fetal bovine serum. *Journal of Animal Science*, 72, 184–191.
- Ferlay, A., Martin, B., Pradel, P., Coulon, J. B., & Chilliard, Y. (2006). Influence of grass-based diets on milk fatty acid composition and milk lipolytic system in Tarentaise and Montbéliarde cow breeds. *Journal of Dairy Science*, 89, 4026–4041.
- Fox, P. F., Law, J., McSweeney, P. L. H., & Wallace, J. (1999). Biochemistry of cheese ripening. In P. F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (pp. 389–438). Gaithersburg, MD, USA: Aspen Publishers Inc.
- Gaya, P., Medina, M., Rodríguez-Marín, M. A., & Nunez, M. (1990). Accelerated ripening of ewes' milk manchego cheese: The effect of elevated ripening temperatures. *Journal of Dairy Science*, 73, 26–32.
- Glaccone, D., Revello-Chion, A., Galassi, L., Bianchi, P., Battelli, G., Coppa, M., et al. (2016). Effect of milk thermisation and farming system on cheese sensory profile and fatty acid composition. *International Dairy Journal*, 59, 10–19.
- Gómez-Cortés, P., Frutos, P., Mantecón, A. R., Juárez, M., de la Fuente, M. A., & Hervás, G. (2009). Effect of supplementation of grazing dairy ewes with a cereal concentrate on animal performance and milk fatty acid profile. *Journal of Dairy Science*, 92, 3964–3972.
- Gomi, G. (1946). Buffers in the range of pH 6.5 to 9.6. *Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine*, 6, 233–234.
- Grappin, R., & Beuquier, E. (1997). Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal*, 7, 751–761.
- IDF. (1990). Milk and milk products. Enumeration of microorganisms (colony count technique at 30°C). *IDF standard 100B*. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- Irlinger, F., & Mounier, J. (2009). Microbial interactions in cheese: Implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 142–148.
- Isolati, D., Grand, M., & Glättli, H. (1990). Selective medium for the detection of obligatory and facultative heterofermentative lactobacilli. *Schweizerische Milch-wirtschaftliche Forschung*, 19, 57–59.
- Jellema, A., Anderson, M., Heeschen, W., Kuzdal-Savoie, S., Needs, E. C., Suhren, G., et al. (1991). Determination of free fatty acids in milk and milk products. *IDF bulletin N°265*. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- Kahara, J. J., Swieczkowski, D. M., Conley, A. J., & Truant, J. P. (1972). Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2, 21–28.
- Kay, J. K., Weber, W. J., Moore, C. E., Bauman, D. E., Hansen, L. B., Chester-Jones, H., et al. (2005). Effects of week of lactation and genetic selection for milk yield on milk fatty acid composition in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 88, 3886–3893.
- Kierozczyk, A., Skow, S., Olsen, K., & Langstrol, T. (2001). Metabolism of amino acids by resting cells of non-starter lactobacilli in relation to flavour development in cheese. *International Dairy Journal*, 11, 217–224.
- Lerch, S., Ferlay, A., Graulet, B., Cliré, C., Verdier-Metz, I., Montel, M. C., et al. (2015). Extruded linseeds, vitamin E and plant extracts in corn silage-based diets of dairy cows: Effects on sensory properties of raw milk and uncooked pressed cheese. *International Dairy Journal*, 51, 65–74.
- Lucas, A., Rock, E., Chamba, J. F., Verdier-Metz, I., Brachet, P., & Coulon, J. B. (2006). Respective effects of milk composition and the cheese-making process on cheese compositional variability in components of nutritional interest. *Lait*, 86, 21–41.
- Marilley, L., & Casey, M. G. (2004). Flavours of cheese products: Metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 139–159.
- Martin, B., Pomies, D., Pradel, P., Verdier-Metz, I., & Rémond, B. (2009). Yield and sensory properties of cheese made with milk from Holstein or Montbéliarde cows milked twice or once daily. *Journal of Dairy Science*, 92, 4730–4737.
- Martin, B., Verdier-Metz, I., Buchin, S., Hurtado, C., & Coulon, J. B. (2005). How do the nature of forages and pasture diversity influence the sensory quality of dairy livestock products? *Animal Science*, 81, 205–212.
- Mayer, J. V., Sandline, W. E., & Eliker, P. R. (1962). A selective medium for detecting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science*, 45, 655–661.
- Monnet, C., Landaud, S., Bonnarrie, P., & Swennen, D. (2014). Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. *FEMS Microbiology Letters*, 263, 1–9.
- Montel, M. C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paut, C., Vuitton, D. A., Desmasure, N., et al. (2014). Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 136–154.
- Mossel, D. A. A., Mengerink, W. H. J., & Scholts, H. H. (1902). Use of a modified MacConkey agar medium for selective growth and enumeration of all Enterobacteriaceae. *Journal of Bacteriology*, 84, 381–384.
- Mossel, D. A. A., Visser, M., & Mengerink, W. H. J. (1962). A comparison of media for the enumeration of moulds and yeasts in food and beverages. *Laboratory*, 11, 109–112.

- Nozière, P., Graulet, B., Lucas, A., Martin, B., Grolier, P., & Doreau, M. (2006). Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Animal Feed Science and Technology*, 131, 418–450.
- Pires, J. A. A., Chilliard, Y., Delavaud, C., Rouel, J., Pomiès, D., & Blanc, F. (2015). Physiological adaptations and ovarian cyclicity of Holstein and Montbéliarde cows under two low-input production systems. *Animal*, 9, 1986–1995.
- Shingfield, K. J., Bernard, L., Leroux, C., & Chilliard, Y. (2010). Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal*, 4, 1140–1166.
- Slanetz, L. C. W., & Bartley, C. H. (1957). Numbers of enterococci in water, sewage and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *Journal of Bacteriology*, 74, 591–596.
- Van Boekel, M. A. (1998). Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chemistry*, 62, 403–414.
- Van Hekken, D. (2012). Quality aspects of raw milk cheeses. *Food Technology*, 66, 66–78.
- Verdier-Metz, I., Coulon, J. B., Pradel, P., Viaillon, C., Albouy, H., & Berdagüe, J. L. (2004). Effect of botanical composition of hay and casein genetic variants on the chemical and sensory characteristics of ripened Saint-Nectaire type cheese. *Lait*, 80, 300–370.
- Verdier-Metz, I., Martin, B., Hulst, S., Ferlay, A., Pradel, P., & Coulon, J. B. (2002). Combined influence of cow diet and pasteurisation of milk on sensory properties of French PDO Cantal cheese. In CIDIL (Ed.), *Proceedings of Congrès 26th IDF world dairy congress*, Paris, France: CIDIL.

Article 2 : Bacterial community assembly from cow teat skin to ripened cheeses according to the grazing systems

Frétin Marie^{1,2}, Martin Bruno², Rifa Etienne¹, Verdier-Metz Isabelle¹, Pomiès Dominique², Ferlay Anne², Montel Marie-Christine¹, Delbès Céline¹

¹ INRA, UR545 Fromagères, Côte de Reyne, F-15000 Aurillac, France

² INRA, UMR1213 Herbivores, VetAgro Sup, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

Ce deuxième article consistait à étudier l'assemblage des communautés bactériennes de la peau des trayons des vaches laitières jusqu'aux fromages affinés de type Cantal selon les systèmes de production du lait au pâturage, en utilisant l'approche « metabarcoding ».

Cet article sera prochainement soumis au journal *Environmental Microbiology*.

1. Introduction

The microbiota of raw milk plays a primordial role in the development of cheese flavour, its shelf-life and safety (Duthoit et al., 2005; Montel et al., 2014). The composition of milk microbiota depends on the microbial composition of different sources directly in contact with the milk: teat skin of cows and dairy equipment such as milking machine, milk line and tank. Besides starters and ripening cultures added, the environment and equipment of cheese-making and ripening can further influence the microbiota of raw milk cheeses (Irlinger et al., 2015). A recent study brought new elements to understand the potential microbial transfers from cheese-making facility environment to cheese surface (Bokulich and Mills, 2013).

The teat skin of cows is often considered as a main reservoir of microbial diversity of raw milk because many bacterial genera found in raw milk were detected on teat skin (Montel et al., 2014; Quigley et al., 2013; Vacheyrou et al., 2011; Verdier-Metz et al., 2012). This microbial community is dominated by many microorganisms which may grow in cheeses during the ripening such as lactic acid bacteria and *Proteobacteria*. To our knowledge, no study has showed a direct link between the microbiota of teat skin and the microbiota of raw milk cheeses.

Verdier-Metz et al. (2012) showed that the microbial community of cow teat skin varied from one farm to another. The microorganisms can colonize the teat skin by contact with the bedding material that depends on animal feeding and housing conditions (Verdier-Metz et al., 2012; Zdanowicz et al., 2004). The stable environment (air, dust) and the hygienic practices of farmers during milking (washing of milking equipment, pre- and post-milking teat care practices) are potential sources of bacteria and fungi (Vacheyrou et al., 2011; Verdier-Metz et al., 2009). The dairy farm environment and the farming practices have therefore become a focus of interest for researchers studying cheese microbial ecology since they may influence the milk microbiota.

Several authors showed that the flavour of raw milk cheeses was more intense and diversified when cows grazed fresh grass in comparison to preserved forages (Bonanno et al., 2013; Carpino et al., 2004; Martin et al., 2005). The characteristics of grassland pastures vary widely according to production area and is therefore related to the concept of “terroir”. These variations create more or less favourable conditions (relative humidity, temperature and ultra-violet radiation) for the colonisation of the phyllosphere by bacteria, yeasts and filamentous fungi (Behrendt et al., 1997). In addition, the composition of animal feeding is known to affect the structure of the microbial community in the rumen as well as in the faeces (Callaway et al., 2010; Tajima et al., 2001).

The recent advances of high-throughput sequencing provide a powerful means to analyse dominant and subdominant populations and their dynamics in highly complex ecosystems (O’Sullivan et al., 2015; Quigley et al., 2012). The DNA-based metabarcoding approach offers the opportunity to monitor the Operational Taxonomic Unit (OTU) across different successive habitats.

The aim of this work was to explore the bacterial community assembly from cow teat skin to raw milk ripened cheeses and to test the hypothesis that the grazing system could be a lever to shift the microbial balance of raw milk and cheese *via* the microbiota of teat skin. For this purpose, we implemented an experiment including two herds from the same farm reared separately for two years in two grazing systems, whose milk was collected and transformed under identical conditions. We investigated the bacterial populations of teat skin, raw milk cheese rind and core using high-throughput sequencing.

2. Materials and methods

2.1 Experimental design

The experiment was carried out at the experimental farm of Marcenat (INRA, UE1414 Herbipôle, France), which is located in an upland mountainous grassland area in central France (altitude 1135-1215 m). The study was conducted in 2012 during the 2nd year of a long-term experiment (Pires et al., 2015) where a total of 24 Holstein and 24 Montbeliarde spring-calving dairy cows and their corresponding heifers were divided in two independent farmlets denominated extensive (**EXT**) and semi-extensive (**SEMI**) as previously described by (Frétin et al., 2017). Briefly, the EXT system consisted of 60 ha of highly diversified grasslands fertilized with 30 kg/ha/year of organic nitrogen and no mineral fertilization. Dairy cows received no concentrate. The SEMI system comprised 30 ha of less diversified grasslands fertilized with 50 kg/ha of organic nitrogen and 27 kg/ha of mineral ammonium nitrates on the paddocks to be grazed. The SEMI dairy cows received daily four kilograms of a pelleted concentrate (40% wheat, 30% barley, 25% maize and 5% molasses) distributed in a collective feed trough. Two periods of three dates (5th, 10th, and 12th July 2012; 6th, 11th, and 13th September 2012) were chosen to examine the effects of the two grazing systems at different phenological stages of grass from pastures on the microbiota of teat skin, milk and cheese. On each date, SEMI and EXT cows were milked successively on the same machine milking. All teats of all cows received a sterile 85%–glycerol post-dipping solution at the end of each milking.

2.2 Teat skin surface samples

The day before each milking, for each cow, skin all four teats was swabbed as described previously by Verdier-Metz et al. (2012) with a moist sterile swab. Individual swab suspensions were stored at -20°C until analysed. On the day of analysis, they were thawed at 25°C then were pooled by grazing system (EXT and SEMI) and by day of cheese-making for metagenomic analyses. Overall, 12 teat samples were analysed (2 grazing systems x 2 periods x 3 cheese-making dates).

2.3 Cheese production

For each cheese-making date and for each grazing system, the evening milk was cooled to 4°C, then the next day, the morning milk was added. This bulk milk was carried up to the cheese-making

facility (1h30 transport) in airtight cans filled to the brim. Small-size Cantal cheeses (10 kg) were manufactured from 110 L of EXT or SEMI raw milk in separate vats as previously described by (Frétin et al., 2017). All milks were inoculated with 0.05 g 100 kg⁻¹ of a mesophilic starter culture (Flora Danica Direct, Chr. Hansen, Arpajon, France, consisting of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, and *Leuconostoc mesenteroides* spp. *cremoris*), then a ripening starter (1.3 mL of Monilev consisting of *Debaryomyces hansenii* and *Sporendonema casei*, and 1.3 mL of Penbac consisting of *Brachybacterium tyrofermentans*, *Brevibacterium linens*, and *Penicillium fuscoglaucum*, Laboratoire Interprofessionnel de Production, Aurillac, France) was inoculated on hessian cloths at the stage of moulding. Overall, 12 cheeses made from raw milk (2 grazing systems x 2 periods x 3 cheese-making dates) were ripened during 20 weeks. Milk and cheese samples were then collected as detailed by (Frétin et al., 2017) until the bacterial population counts and metabarcoding analyses.

2.4 Diversity of cultivable bacteria in milks

Milk samples were enumerated on 4 elective media for the main microbial groups of milk: total mesophilic bacteria on plate count agar medium (PCAM), lactic acid bacteria on Man Rogosa Sharpe medium (MRS), Gram-positive catalase-positive bacteria on cheese-ripening bacterial medium (CRBM), and Gram-negative bacteria on PCAM with vancomycin and crystal violet added (PCAI) (Frétin et al., 2017). For each milk sample, one specimen of each different colony morphotype was picked up from each bacterial group and mixed with 2 µL of sterile water. PCR amplifications of 16S rRNA genes (~1500 bp) were carried out directly from 2 µL of water suspensions using the universal primers W02 (5'-GNTACCTTGTTACGACTT-3') and W18 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'). The amplification reaction was carried out in a final volume of 50 µL containing 2.5 mM of a deoxynucleoside triphosphate (dNTP) mixture, 10 X buffer with MgCl₂, 5 U of Taq DNA polymerase, and 10 µM of each primer. The PCR amplification was performed under the following conditions: 10 min at 94°C, 30 cycles of amplification of 30 s at 94°C, 30 s at 50°C and 1 min 30 s at 72°C, followed by a final extension step of 72°C for 10 min. The 253 amplified products (112 colonies from PCA, 17 from MRS, 51 from CRBM, and 73 from PCAi) were sequenced using the W18 primer by LGC Genomics GmbH (Berlin, Germany). The 800 bp of the 5' ends obtained for the 16S rRNA genes of the isolates were compared to sequences available in the GenBank database, using the BLASTn program. Sequences with a percentage similarity of 99% or higher were considered to be representative of the same species.

2.5 Metabarcoding analysis

Phenol-based extraction method and purification of total bacterial DNA

To extract the total bacterial DNA from teat skin and raw milk, 150 µL of pronase (10 mg/mL; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) were added to 10 mL of teat suspension and milk samples and

heated at 37°C for 2h30. One milliliter of SDS (sodium dodecyl sulphate 20% solution) was added to each sample, which was then incubated for 1 h at 37°C. The fat was extracted by 20 min of centrifugation (8500g, 4°C). Then, 130 µL of 4 M guanidine thiocyanate–0.1 M Tris (pH 7.5), 20 µL of 10% *N*-lauroylsarcosine, 200 µL of 0.1 M phosphate buffer (pH 8) and 200 µL of 50 mM sodium acetate–10 mM EDTA (pH 6) were added to pellet. The 2-mL tube containing the above suspension was filled with 200 mg of zirconium beads and 200 µL of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1, pH 8). The following steps were described by Duthoit et al. (2003). At the end, the nucleic acids pellet was washed, dried, suspended in 50 µL of water and treated with 5 µL of RNase (10 µg/mL; VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, France).

The total bacterial DNA extraction from core and rind of cheeses was performed as previously described by Duthoit et al. (2003). The nucleic acids pellets were suspended in 70 µL of water and treated with 7µL of RNase. All the DNA solutions (teat suspension, milk, and cheese) were stored at -20°C.

Next generation amplicon sequencing

The total bacterial DNA extracted from teat suspension and milk samples (extracted DNA) was amplified using the Illustra™ Ready-To-Go™ GenomiPhi™ V3 DNA Amplification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

The variable region V3-V4 of the 16S rRNA gene (~510 bp) was directly amplified from 2 µL of extracted and pre-amplified DNA (teat suspension and milk) or extracted DNA (cheese) with the primers PCR1F_460 (5'-TACGGRAGGCAGCAG-3') and PCR1R_460 (5'-TTACCAGGGTATCTAATCCT-3') using the following protocol: 94°C for 60 s; 30 cycles of 94°C for 60 s, 65°C for 60 s, 72°C for 60 s, and 72°C for 10 min. The amplification reaction was carried out in a final volume of 50 µL containing 10 mM dNTP mixture, 20 µM of each primer, 10X MTP Taq Buffer and 5U of MTP™ Taq DNA polymerase (Sigma-Aldrich, France). The amplified products were submitted to the NED team (UMR1388 GenPhySe, France) for Illumina paired-end library preparation and cluster generation, then to GeT-PLaGE platform (Toulouse, France) for 250 bp paired-end sequencing on an Illumina MiSeq instrument.

Data analysis

The sequence data were processed using FROGS pipeline on Galaxy interface (Escudie et al., 2015). After a quality control, the contiged reads were filtered to minimize the effects of random sequencing errors: (i) contigs with a length between 400 and 500 bp were kept, (ii) contigs where the two primers were missing were eliminated, (ii) contigs with ambiguous nucleotides were discarded. Reads were clustered (aggregation distance of 3) with Swarm (Mahé et al., 2014), then chimeric sequences in each sample were removed using VSEARCH tool (Torbjørn Rognes et al., 2016). To filter on singletons and chimeric sequences, OTUs with proportional counts below 0.005% across all samples

were removed (Bokulich et al., 2013). The taxonomy assignment was performed with blastn+ against the pre-processed SILVA123-16S database. The OTUs present just once in a given environment (teat skin, milk, cheese core and rind) were removed.

2.6 Statistical analyses

Rarefaction curves, diversity indices of Shannon (Shannon, 1948), Simpson (Simpson, 1949), and richness estimator Chao1 (Chao, 1984) were calculated on non-normalised data to infer on richness and evenness in the samples. These data were analysed by a multi-way analysis of variance (ANOVA) with R (version 3.1.0), including variables corresponding to the grazing system used (S), the period of cheese-making (P), and their interactions as fixed factors. Significance was declared at $P < 0.05$.

Before the following analyses, Total Sum Scaling (TSS) normalisation was performed on each sample using the total sum of sample with the weakest depth of sequencing, except for milk samples because the rarefaction curves didn't showed an asymptote suggesting an insufficient sampling of the bacterial communities of milks (data not shown). The linear discriminant analysis (LDA) effect size (LefSe) method (available at <http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy>) was used with the relative abundance data to ascertain any significant differences in taxonomic abundance between two grazing systems (Segata et al., 2011). The LDA analysis generates a list of discriminant taxonomic units with a $P < 0.05$. The LDA score allows to rank the OTUs based on their relevance, between 5.2 and 2.5 with the present dataset. The multivariate partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) was performed on the normalized log-transformed OTU abundance of overall samples considering as factor the combination of qualitative variables: habitats (cow teat skin, milk, cheese core and cheese rind) and grazing systems (EXT and SEMI). PLS-DA was carried out with the R package mixOmics (Le Cao et al., 2016). The OTU networks were generated by QIIME pipeline (Caporaso et al., 2010) and networks were visualized using Cytoscape 3.4.0 (Shannon et al., 2003) by applying the spring embedded layout. Venn diagrams were generated using Jvenn (available at <http://bioinfo.genotoul.fr/jvenn>) (Bardou et al., 2014).

3. Results

3.1 Bacterial composition of cow teat skin and dairy products samples

A total of 1,636,464 reads were kept and distributed to 365 OTUs after filtration steps. The species richness (Chao1) and diversity (Simpson and Shannon indices) were calculated for each grazing system in each habitat (Table 1; individual results of sample diversity are presented in Table S1). The highest number of OTUs observed was found in teat skin samples (on average between 255 and 268 OTUs). The number of OTUs in milk and cheese samples was much lower (< 71 OTUs). The OTUs richness was close to the OTUs number observed for teat skin samples. The diversity indices revealed a decreased diversity from teat skin to ripened cheeses as well as a higher diversity on cheese rind than in cheese core. The species richness and diversity didn't differ significantly according to the grazing

system in any habitat.

The predominant phylum in cow teat skin samples was *Firmicutes* (56.5% of the total bacterial reads; Table 2) followed by *Actinobacteria* and *Proteobacteria* (39.5% and 4.02%, respectively). A total of 300 OTUs was obtained of which 18 had a relative abundance above 1%, and 98 bacterial genera were identified. An additional phylum named *Bacteroidetes* (0.87%) was detected in milks. A total of 112 OTUs were obtained in milk of which 17 had a relative abundance above 1%, and 52 bacterial genera were identified. The phylum *Fusobacteria* was only detected in cheeses. In cheese core, a total of 43 OTUs was obtained and 14 bacterial genera were identified. Only one OTU assigned to *Lactococcus lactis* had a relative abundance above 1% (on average, a relative abundance of 97.4%). In cheese rind, a total of 75 OTUs was obtained of which only 5 OTUs had a relative abundance above 1%, and 23 bacterial genera were identified. The culture-dependent analysis of milk samples showed that the proportion of phyla among isolates was similar to that found by metabarcoding approach (Table S2). However, 3 isolates assigned to the phylum *Deinococcus-Thermus* were detected in EXT milks. In total, 34 bacterial genera were identified of which 12 genera were not detected by metabarcoding (genera underlined in Table S2), especially in the phylum *Actinobacteria*.

3.2 Effect of grazing system on OTUs abundance profiles in the different habitats from teat skin to ripened cheeses

The PLS-DA was performed to identify the OTUs that contribute the most to the variance between samples originating from each grazing system for every habitat considered (Figure 1). The first and third principal components (PC) accounted for 62% of the total variance (Figure 1A). In July, the OTUs that contribute the most to the PC3 discriminating the EXT from the SEMI system were mainly identified in teat skin samples (Figure 1B). This tendency was similar in September even if the OTUs number on cow teat skin with differential abundance was lower in September than in July.

A discriminant analysis on teat skin samples pointed out multiple significant differences in bacterial taxa relative abundance depending on grazing system at the two periods (Figure 2). Complete results of discriminant analysis, corresponding to the LDA score and *p-value*, are included in Tables S3 and S4. For every period studied, the relative abundance of the class *Bifidobacteriales* (LDA score >4) including *B. pseudolongum* (OTU6), *B. choerinum* (OTU36), and *B. merycicum* (OTU52), and of *Atopobium* sp. (OTU75 and OTU212), *Clostridium* sp. (OTU35) and *Ruminococcaceae* (OTU197) was higher on teat skin of cows reared in the SEMI system than on that of EXT cows. The relative abundance of *Gordonibacter* sp. (OTU329) and *Lachnospiraceae* (OTU362) was lower on teat skin of SEMI cows than EXT cows at both periods. In July, the relative abundance of 59 OTUs was significantly ($P < 0.05$) different on teat skin of EXT and SEMI cows (Figure 2A). The class *Coriobacteriia* including the genus *Atopobium* (OTU112, OTU124 and OTU130), was the most discriminant taxon (LDA score >4) and its abundance was higher on EXT teat skin than on SEMI teat skin (1.72% and 0.60%, respectively). Likewise, a higher abundance of the family *Lachnospiraceae* including *Acetitomaculum* sp. (OTU37),

Coprococcus sp. (OTU191) and *Lachnospiraceae* (OTU88 and OTU203) was observed on EXT than on SEMI teat skin (LDA score >3; 4.63% and 1.47%, respectively). The relative abundance of *Aerococcus*, *Corynebacterium* sp. (OTU12, OTU137, OTU444) and *Mogibacterium* sp. (OTU135) was also higher on EXT teat skin. Among the family *Christensenellaceae*, 11 out of 28 OTUs were relatively more abundant on EXT than on SEMI teat skin. Conversely, the major discriminant taxa (LDA score >3), whose relative abundance was significantly higher on SEMI than on EXT teat skin, included *Bacillus* sp. (OTU141) and *Clostridium* sp. (OTU85). Concerning the period of September, 24 OTUs had a significantly different abundance ($P < 0.05$) according to the grazing system (Figure 2B). Among the most discriminant taxa with an LDA score higher than 4, the class *Corynebacteriales* was less abundant on SEMI teat skin compared to EXT teat skin (17.1% and 34.5%, respectively). Other major discriminant taxa (LDA score >3), whose relative abundance was significantly higher on SEMI teat skin than on EXT teat skin, included *Rhodococcus*, *Lactococcus lactis* (OTU1), *Ruminococcus* sp. (OTU216, OTU322, OTU334), *Clostridium* sp. (OTU321). On the contrary, the relative abundance of *Aminobacter* sp. (OTU169), *Terrisporobacter* sp. (OTU357), and *Christensenellaceae* (OTU370) was higher on EXT than on SEMI teat skin.

In raw milks, cheese cores and cheese rinds, taxa with differential abundance between EXT and SEMI systems were less numerous and often in low relative abundance in July and September (Tables S5, S6 and S7). In July, among the most dominant taxa whose abundance was modified depending on the system, the relative abundance of the class *Gammaproteobacteria* including the order *Pseudomonadales* was higher in EXT milks than in SEMI milks (LDA score >4; 3.48% and 0.14%, respectively; Table S5). Concerning cheeses, the relative abundance of *Lactobacillus helveticus* (OTU27) and *Lactobacillus* sp. (OTU229) was higher in EXT than SEMI cheeses for both core and rind (Tables S6 and S7). The family *Lactobacillaceae* including *Lactobacillus parabuchneri* (OTU57) and *Lactobacillus* sp. (OTU180) was found to be more abundant in EXT than in SEMI cheese cores (LDA score >4; 1.52% and 0.66%, respectively, Table S6). In September, the phylum *Firmicutes* was the most discriminant taxon (LDA score >5), whose relative abundance was higher in SEMI milks than in EXT milks (48.5% and 19.9%, respectively; Table S5). Concerning cheeses, *L. lactis* (OTU46) and *Lactococcus* sp. (OTU48 and OTU89) had a high abundance in SEMI than in EXT cheeses for both core and rind (Tables S6 and S7). The relative abundance of *Brevibacterium* sp. (OTU94) was higher in SEMI rinds (Table S7).

3.3 Network analysis of the bacterial OTUs across the successive habitats from teat skin to ripened cheeses

The OTU network clearly showed a separation between the teat skin, milk and cheese core/rind samples whatever the grazing system and period tested (Figure 3A). The Venn diagram indicated specific and common OTUs from teat skin to ripened cheeses (Figure 3B). The relative abundance of

133 OTUs found in at least two habitats was detailed in Table S8. Among the 300 OTUs detected on teat skin, one third (99 OTUs) was also found in dairy products. Among the 112 OTUs detected in milks, 95 were also detected on teat skin whereas 9 OTUs potentially from other environmental sources (not detected on teat skin) were found both in milk and cheese, namely *Brevibacterium linens* (OTU11), *Bifidobacterium* sp. (OTU18), *Lactobacillus helveticus* (OTU27), *Lactobacillus* sp. (OTU57), *Pseudomonas* sp. (OTU104), *Acinetobacter guillouiae* (OTU299), *Acinetobacter* sp. (OTU312), *Corynebacterium* sp. (OTU328), and *Chryseobacterium* sp. (OTU372). Among the 43 OTUs detected in cheese cores, 10 were also found both in teat skin and milk. Only *Fastidiosipila* sp. (OTU417) was detected both in cheese core and teat skin but not in milk. Three of the OTUs present in cheese core were not detected in cheese rind: *Lactococcus coryniformis* (OTU59), *Staphylococcus chromogenes* (OTU67), and *Acinetobacter* sp. (OTU312). Among the 75 OTUs detected in cheese rinds, 16 were detected both on teat skin and in milk; however, 4 OTUs were detected both in cheese rind and on teat skin but not in milk: *Brevibacterium* sp. (OTU42), *Brachybacterium sacelli* (OTU44), *Yaniella* sp. (OTU54), and *Fastidiosipila* sp. (OTU417). There were 22 OTUs that were only detected in cheese rinds of which the majority is assigned to phylum *Actinobacteria* including *Brevibacterium* sp. (OTU50, OTU80, OTU94, OTU102, OTU117, OTU129, OTU140, OTU150, OTU163, OTU179), *Brachybacterium* sp. (OTU41, OTU133, OTU194), and *Nocardiopsis* sp. (OTU5, OTU47, OTU236, OTU287). Finally, the following 9 OTUs were found in all samples. The relative abundance of *Lactococcus lactis* (OTU1), *Lactobacillus* sp. (OTU13) and *Lactococcus* sp. (OTU48) increased from teat skin to dairy products (Table S8). *Brevibacterium* sp. (OTU4) had a higher abundance in cheese rind than in cheese core, milk, and teat skin. The relative abundance of *Staphylococcus* sp. (OTU16), *Macroccoccus caseolyticus* (OTU51), *Streptococcus* sp. (OTU53) and *Streptococcus dysgalactiae* (OTU81) was higher on teat skin and milk than in cheese. *Escherichia coli* (OTU90) had a very low abundance in the four habitats.

4. Discussion

4.1 Effect of grazing system on the bacterial balance on teat skin, in milk and in cheese

The present experimentation was designed to focus on the effect of grazing systems, knowing that the dairy equipment (milking machine, milk line and tank) and the equipment and parameters of cheese-making were strictly identical. We made the assumption that this long-term experiment (initiated for one year) allowed adaptation of the microbial community structure in the environment of each system.

The highest differences of microbial communities found between the grazing systems concern teat skin microbiota. The soil surface and phyllosphere microbiota of the grazed paddocks could be a major factor explaining the observed bacterial differences, especially in the grassland areas used by cows for bedding. We can make the assumption that the higher botanical diversity of EXT grasslands and the fertilization of SEMI grasslands can modify the abundance, diversity and activity of soil

microbial communities as previously evidenced (Jangid et al., 2008; Loranger-Merciris et al., 2006). Nevertheless, the relationships between phyllosphere and teat skin microbiota are not understood yet. In the bedding areas, the faeces could also be a potential source of microorganisms for cow teat skin. The animal feeding is known to modify the balance of ruminal microbiota (Tajima et al., 2001; Zened et al., 2013) and therefore the faeces microbiota. In this study, the daily distribution of concentrate to the SEMI cows in a collective feed trough could cause an acidosis on the dominant cows that possibly ingested high amounts of concentrates. Indeed, the fat-to-protein-ratio below the threshold of 1 for 5 SEMI cows in July and 2 SEMI cows in September (data not shown) suggests that these SEMI cows could be in subacute ruminal acidosis (Enemark, 2008) contrary to EXT cows. The drop of ruminal pH disrupts the microbiota of the rumen (Tajima et al., 2001) as well as the faecal microbiota (Mao et al., 2012). Moreover, the teat skin of SEMI cows could be more easily in contact with the faeces in the bedding areas because of the higher stocking rate on grassland paddock compared to EXT system. We observed that the relative abundance of 9 OTUs found on teat skin of cows was significantly different between the two grazing systems both in July and in September. The relative abundance of OTUs assigned to *B. choerinum*, *B. merycicum*, *B. pseudolongum*, *Atopobium* sp., and *Ruminococcaceae* was higher on teat skin of SEMI than EXT cows. Similarly, Mao et al. (2013) reported a higher abundance of the *Atopobium*, *Bifidobacterium* and *Ruminococcus* genera in the rumen microbiota during acidosis. Despite their low abundance on teat skin, we found that the abundance of *Solibacillus* sp. was lower while that of *Turicibacter* sp. was higher on teat skin of SEMI cows compared to EXT cows, in July. In another study, Mao et al. (2012) observed the same shift in the structure of the faecal microbial community of cows in acidosis.

In July, the grazing system had a strong effect on teat skin microbiota. However, this effect was strongly reduced in raw milk microbiota. Among taxa with a differential relative abundance between the two grazing systems in milk (*Lachnospiraceae* and *Gammaproteobacteria*), none were different in ripened cheese, and only the relative abundance of the family *Lachnospiraceae* was higher for EXT system than for SEMI system both on teat skin and in milk. The effect of grazing system was lower on teat skin microbiota in September than in July, and most OTUs with a differential abundance between EXT and SEMI cows were not the same in July and in September. Several factors such as the maturation stage of grass, the weather changes (temperature, humidity and sunburn), and the lactation stage of cows could be involved in this difference between July and September.

We can hypothesize that the milking of all cows (EXT and SEMI systems) with the same milking machine on the same day had a “funnel-effect” and mitigated the observed differences in milk between the two groups of animals (Figure 1). The addition of the same starter and ripening culture combined with the cheese-making and ripening in the same dairy facility could also explain the levelling of the bacterial differences between EXT and SEMI cheeses.

However, several findings of our study regarding lactic acid bacteria may be of particular importance for the dairy industry. We observed that the relative abundance of *Lactobacillus* sp. and *Lb. helveticus* was higher in July both in core and rind EXT cheeses than in SEMI cheeses. Lactobacilli are sought for their proteolytic activity and ability to produce aroma compounds (Leroy and De Vuyst, 2004). In cheeses made in September, we observed that the relative abundance of *L. lactis* and *Lactococcus* sp. was higher both in core and rind of SEMI cheeses than in those of EXT cheeses. We could hypothesize that the growth of starter culture (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*) may be affected by the biochemical composition of milk, possibly that of fatty acid that was different between the cheeses of the two grazing systems as already reported by Frétin et al. (2017). Nevertheless, the metabarcoding approach allowed neither to discriminate bacteria at the strain level and to specifically monitor starter strains, nor to know whether these taxa were metabolically active.

4.2 Bacterial assembly from teat skin to ripened cheeses

In the current study, metabarcoding approach was used, for the first time, to investigate the bacterial dynamics from cow teat skin to ripened cheeses. The teat skin of cows harbours a high diversity of bacteria (Braem et al., 2012; Monsallier et al., 2012; Verdier-Metz et al., 2012). However, the number and proportion of phyla were different according to the approach used even if the phylum *Firmicutes* always showed the highest abundance. Verdier-Metz et al. (2012) detected 46 bacterial genera/species by culture-dependent method and 78 bacterial genera/species by 16S rRNA genes clone libraries while we can identify 98 bacterial genera encompassing 300 OTUs by metabarcoding approach on cow teat skin.

Nine OTUs were detected all along the way from teat skin to ripened cheeses. These OTUs are assigned to the seven genera (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Brevibacterium*, *Staphylococcus*, *Macroccoccus*, and *Escherichia*) that have been detected both on teat skin and in dairy products by other authors (Montel et al., 2014; Verdier-Metz et al., 2014). The overwhelming majority of OTUs detected in raw milk (85%) was also found on teat skin of cows. Our results confirm that the teat skin can be considered as a major reservoir of microorganisms for raw milk (Vacheyrou et al., 2011). We noticed the presence on teat skin of bacteria potentially useful for cheese-making (*L. lactis*, *Staphylococcus* sp., *Corynebacterium* sp.; Table S8). A third of OTUs detected in raw milk cheeses was also found in raw milk. Among these OTUs, *B. linens*, *Brachybacterium* sp., *Corynebacterium* sp., *S. chromogenes*, and *S. equorum* can be involved in flavour and colour development during ripening (Quigley et al., 2013). Other OTUs belonging to lactic acid bacteria such as *L. helveticus*, *Lactobacillus parabuchneri*, and *Enterococcus* sp. contribute to proteolysis, the conversion amino acids into flavour compounds, and fat metabolism (Franz et al., 1999; Leroy and De Vuyst, 2004; Quigley et al., 2013; Smit et al., 2005). The Gram-negative bacteria (*Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *A. guillouiae*) may participate positively or negatively to the sensory quality of cheeses (Delbès-Paus et al., 2011; Morales

et al., 2005). Almost all OTUs found in cheese core were also detected in cheese rind. The genus *Lactococcus* was dominant both in cheese core and rind (98% and 71% of total abundance, respectively) in agreement with Quigley et al. (2012).

A weak proportion of OTUs (15%) was detected in raw milk but not on teat skin. We can suppose that these OTUs originated from the milking machine and/or the cheese-making equipment (Bokulich and Mills, 2013; Marchand et al., 2012). The high abundance of OTUs assigned to the phylum *Proteobacteria* might be a consequence of storage temperature and storage time to transport the milk from dairy farm to cheese-making facility (Irlinger et al., 2015; Raats et al., 2011). Approximately 63% of OTUs found on cheese rind were not detected in milk in agreement with Wolfe et al. (2014); the rind ecosystem being in contact with the external environment (Almena-Aliste and Mietton, 2014; O’Sullivan et al., 2015). Bokulich and Mills (2013) showed that bacteria and fungi detected in the environment of cheese-making and ripening cellar (shelves, instruments, human contamination, air, water) can be also present in cheeses. Even more so than these environmental microorganisms, the starter and ripening cultures added in milks might compete with the “house” milk microbiota in cheeses. This could explain the shift in dominant OTUs composition and the low number of co-occurring OTUs between milk and cheese. Moreover, we observed that 4 OTUs were detected both on teat skin and in cheese but not in milk. We can hypothesize that these OTUs may be present in milk below the detection threshold (set to 0.005% of total counts) while the cheese may be a more favourable environment to their growth.

5. Conclusion

In this experiment, we aimed to explore whether the bacterial assembly from teat skin of cows until ripened cheeses may be modified by the grazing systems. We highlighted that one third of the OTUs detected on teat skin is found in milk, and a tenth in cheese. Our results disclose the important role of cow teat skin as a potential secondary source for microbial diversity in cheese. The grazing system markedly affected the microbiota of cow teat skin but the differences were much lower in milks and cheeses. We hypothesize that in addition to the facilities of milking, cheese-making and ripening that were the same for the two systems in this study and may have enriched the microbiota of dairy products, the starter and ripening cultures contributed to conceal the effect of grazing systems. The differences could be maximised with more contrasted feeding systems (e.g. outdoor vs. indoor) and a rational use of starter cultures. Further researches are needed on environmental reservoirs such as phyllosphere and soil surface to better understand the microbial assembly from cow teat skin to cheeses.

Acknowledgment

Financial support for this study was provided by the Auvergne region in the framework of a CPER T2ANSH 2013 project SyEL-inAuv (Systèmes d’Elevage laitier innovants en Auvergne). The authors wish to thank the staff of the INRA farm at Marcenat for animal care and René Lavigne for cheese-

making. We are grateful to the NED team (INRA, UMR1388 GenPhySe) for Illumina library preparation and the GeT-PLaGE bioinformatics platform Toulouse Midi-Pyrenees for computing resources.

References

- Almena-Aliste, M., Miettton, B., 2014. Cheese Classification, Characterization, and Categorization: A Global Perspective. *Microbiol. Spectr.* 2. doi:10.1128/microbiolspec.CM-0003-2012
- Bardou, P., Mariette, J., Escudié, F., Djemiel, C., Klopp, C., 2014. jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics* 15, 293. doi:10.1186/1471-2105-15-293
- Behrendt, U., Müller, T., Seyfarth, W., 1997. The influence of extensification in grassland management on the populations of micro-organisms in the phyllosphere of grasses. *Microbiol. Res.* 152, 75–85. doi:10.1016/S0944-5013(97)80026-2
- Bokulich, N.A., Mills, D.A., 2013. Facility-Specific “House” Microbiome Drives Microbial Landscapes of Artisan Cheesemaking Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5214–5223. doi:10.1128/AEM.00934-13
- Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., Gordon, J.I., Knight, R., Mills, D.A., Caporaso, J.G., 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* 10, 57–59. doi:10.1038/nmeth.2276
- Bonanno, A., Tornambè, G., Bellina, V., De Pasquale, C., Mazza, F., Maniaci, G., Di Grigoli, A., 2013. Effect of farming system and cheesemaking technology on the physicochemical characteristics, fatty acid profile, and sensory properties of Caciocavallo Palermitano cheese. *J. Dairy Sci.* 96, 710–724. doi:10.3168/jds.2012-5973
- Braem, G., De Vlieghe, S., Verbist, B., Heyndrickx, M., Leroy, F., De Vuyst, L., 2012. Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity. *Vet. Microbiol.* 157, 383–390. doi:10.1016/j.vetmic.2011.12.031
- Callaway, T.R., Dowd, S.E., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Krueger, N., Bauer, N., Kononoff, P.J., Nisbet, D.J., 2010. Evaluation of bacterial diversity in the rumen and feces of cattle fed different levels of dried distillers grains plus solubles using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. *J. Anim. Sci.* 88, 3977–3983. doi:10.2527/jas.2010-2900
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336. doi:10.1038/nmeth.f.303
- Carpino, S., Horne, J., Melilli, C., Licitra, G., Barbano, D.M., Van Soest, P.J., 2004. Contribution of Native Pasture to the Sensory Properties of Ragusano Cheese*. *J. Dairy Sci.* 87, 308–315. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73169-0
- Chao, A., 1984. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scand. J. Stat.* 11, 265–270.
- Delbès-Paus, C., Irlinger, F., Coton, M., Miszczycha, S., Pochet, S., Helinck, S., Veisseire, P., Callon, C., Thévenot, D., Coton, E., Montel, M.-C., 2011. Benefits and risks associated with Gram-negative bacteria within cheese microbial communities. Presented at the 10th International Meeting on Mountain Cheese, University of Turin, Dronero, Italy, pp. 77–78.
- Duthoit, F., Callon, C., Tessier, L., Montel, M.-C., 2005. Relationships between sensorial characteristics and microbial dynamics in “Registered Designation of Origin” Salers cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 259–270. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.040
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3840–3848. doi:10.1128/AEM.69.7.3840-3848.2003

- Enemark, J.M.D., 2008. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review. *Vet. J., Special Issue: Production Diseases of the Transition Cow* 176, 32–43. doi:10.1016/j.tvjl.2007.12.021
- Escudie, F., Auer, L., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Mariadassou, M., Hernadez-Raquet, G., Pascal, G., 2015. FROGS: Find Rapidly OTU with Galaxy Solution. Presented at the The JOBIM 2015 Conference, Clermont-Ferrand, France.
- Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E., 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* 47, 1–24. doi:10.1016/S0168-1605(99)00007-0
- Frétin, M., Ferlay, A., Verdier-Metz, I., Fournier, F., Montel, M.-C., Farruggia, A., Delbès, C., Martin, B., 2017. The effects of low-input grazing systems and milk pasteurisation on the chemical composition, microbial communities, and sensory properties of uncooked pressed cheeses. *Int. Dairy J.* doi:10.1016/j.idairyj.2016.09.007
- 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
- Jangid, K., Williams, M.A., Franzluebbers, A.J., Sanderlin, J.S., Reeves, J.H., Jenkins, M.B., Endale, D.M., Coleman, D.C., Whitman, W.B., 2008. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2843–2853. doi:10.1016/j.soilbio.2008.07.030
- Leroy, F., De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 67–78. doi:10.1016/j.tifs.2003.09.004
- Loranger-Merciris, G., Barthes, L., Gastine, A., Leadley, P., 2006. Rapid effects of plant species diversity and identity on soil microbial communities in experimental grassland ecosystems. *Soil Biol. Biochem.* 38, 2336–2343. doi:10.1016/j.soilbio.2006.02.009
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M., 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2, e593. doi:10.7717/peerj.593
- Mao, S., Zhang, R., Wang, D., Zhu, W., 2012. The diversity of the fecal bacterial community and its relationship with the concentration of volatile fatty acids in the feces during subacute rumen acidosis in dairy cows. *BMC Vet. Res.* 8, 237. doi:10.1186/1746-6148-8-237
- Mao, S.Y., Zhang, R.Y., Wang, D.S., Zhu, W.Y., 2013. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing. *Anaerobe* 24, 12–19. doi:10.1016/j.anaerobe.2013.08.003
- 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. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 11, 133–147. doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00183.x
- Martin, B., Verdier-Metz, I., Buchin, S., Hurtaud, C., Coulon, J.-B., 2005. How do the nature of forages and pasture diversity influence the sensory quality of dairy livestock products? *Anim. Sci.* 81, 205–212. doi:10.1079/ASC50800205
- Monsallier, F., Verdier-Metz, I., Agabriel, C., Martin, B., Montel, M.-C., 2012. Variability of microbial teat skin flora in relation to farming practices and individual dairy cow characteristics. *Dairy Sci. Technol.* 92, 265–278. doi:10.1007/s13594-012-0064-7
- 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
- Morales, P., Fernández-García, E., Nuñez, M., 2005. Volatile Compounds Produced in Cheese by *Pseudomonas* Strains of Dairy Origin Belonging to Six Different Species. *J. Agric. Food Chem.* 53, 6835–6843. doi:10.1021/jf050717b
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2525–2533. doi:10.1128/AEM.04054-14
- Pires, J. a. A., Chilliard, Y., Delavaud, C., Rouel, J., Pomiès, D., Blanc, F., 2015. Physiological adaptations and ovarian cyclicity of Holstein and Montbéliarde cows under two low-input production systems. *animal* 9, 1986–1995. doi:10.1017/S1751731115001317

- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5717–5723. doi:10.1128/AEM.00918-12
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D., 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 664–698. doi:10.1111/1574-6976.12030
- 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 Microbiol.* 28, 465–471. doi:10.1016/j.fm.2010.10.009
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S., Huttenhower, C., 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 12, R60. doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60
- Shannon, C.E., 1948. A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.* 27, 379–423, 623–656.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., 2003. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504. doi:10.1101/gr.1239303
- Simpson, E.H., 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163, 688.
- Smit, G., Smit, B.A., Engels, W.J.M., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 591–610. doi:10.1016/j.fmrre.2005.04.002
- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Benno, Y., 2001. Diet-Dependent Shifts in the Bacterial Population of the Rumen Revealed with Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2766–2774. doi:10.1128/AEM.67.6.2766-2774.2001
- Torbjørn Rognes, Tomáš Flouri, Ben Nichols, Christopher Quince, Frédéric Mahé, 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. doi:10.7287/peerj.preprints.2409v1
- 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. *Int. J. Food Microbiol.* 146, 253–262. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.033
- Verdier-Metz, I., Gagne, G., Bornes, S., Monsallier, F., Veisseire, P., Delbès-Paus, C., Montel, M.-C., 2012. Cow Teat Skin, a Potential Source of Diverse Microbial Populations for Cheese Production. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 326–333. doi:10.1128/AEM.06229-11
- Verdier-Metz, I., Michel, V., Delbès, C., Montel, M.-C., 2009. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiol.* 26, 305–310. doi:10.1016/j.fm.2008.12.005
- Verdier-Metz, I., Pradel, P., Monsallier, F., Montel, M.C., 2014. Effect of post-milking treatment on teat skin and milk microbial diversity of dairy cows, in: *Options Méditerranéennes. Presented at the Forage resources and ecosystem services provided by Mountain and Mediterranean grasslands and rangelands, Clermont-Ferrand, France*, p. 843.
- 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
- Zdanowicz, M., Shelford, J.A., Tucker, C.B., Weary, D.M., von Keyserlingk, M.A.G., 2004. Bacterial Populations on Teat Ends of Dairy Cows Housed in Free Stalls and Bedded with Either Sand or Sawdust. *J. Dairy Sci.* 87, 1694–1701. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73322-6
- Zened, A., Combes, S., Cauquil, L., Mariette, J., Klopp, C., Bouchez, O., Troegeler-Meynadier, A., Enjalbert, F., 2013. Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83, 504–514. doi:10.1111/1574-6941.12011

Table 1. Alpha-diversity inferred from 16S rRNA sequence data according to period and grazing system for teat skin and dairy product samples¹

	Period	System ²	No. sequenced tags		No. of observed OTUs	Chao1	Simpson	Shannon
Teat skin	July	EXT	30,492	(± 4,835)	268 (± 10.8)	285 (± 9.82)	0.94 (± 0.02)	3.77 (± 0.28)
		SEMI	27,584	(± 4,824)	255 (± 15.9)	272 (± 11.4)	0.92 (± 0.02)	3.47 (± 0.28)
	September	EXT	26,926	(± 3,042)	265 (± 10.8)	284 (± 4.41)	0.95 (± 0.01)	3.90 (± 0.06)
		SEMI	29,070	(± 19,855)	256 (± 24.0)	275 (± 13.7)	0.91 (± 0.09)	3.66 (± 0.73)
	July	EXT	3,221	(± 3,455)	39 (± 18.5)	58.2 (± 32.0)	0.80 (± 0.14)	2.31 (± 0.61)
		SEMI	3,057	(± 2,160)	29 (± 4.00)	34.9 (± 1.23)	0.72 (± 0.20)	1.90 (± 0.76)
Raw milk	September	EXT	4,958	(± 490)	53 (± 20.4)	71.2 (± 22.5)	0.81 (± 0.06)	2.44 (± 0.40)
		SEMI	2,652	(± 1,659)	53 (± 16.5)	90.0 (± 35.8)	0.88 (± 0.02)	2.67 (± 0.18)
	July	EXT	53,527	(± 13,980)	39 (± 1.53)	49.2 (± 4.67)	0.07 (± 0.03)	0.24 (± 0.07)
		SEMI	42,593	(± 11,455)	38 (± 1.53)	56.7 (± 17.9)	0.05 (± 0.01)	0.18 (± 0.02)
Cheese core	September	EXT	37,211	(± 7,221)	37 (± 1.53)	56.7 (± 16.9)	0.04 (± 0.01)	0.16 (± 0.03)
		SEMI	65,215	(± 26060)	35 (± 1.00)	54.6 (± 4.51)	0.06 (± 0.01)	0.21 (± 0.04)
	July	EXT	43,805	(± 2,449)	69 (± 1.15)	80.7 (± 1.92)	0.46 (± 0.12)	1.21 (± 0.27)
		SEMI	46,774	(± 12,145)	71 (± 1.73)	80.4 (± 4.79)	0.48 (± 0.19)	1.26 (± 0.38)
Cheese rind	September	EXT	45,554	(± 34,039)	67 (± 3.21)	89.3 (± 14.6)	0.47 (± 0.26)	1.17 (± 0.53)
		SEMI	82,849	(± 46,226)	69 (± 5.51)	83.8 (± 9.39)	0.46 (± 0.08)	1.15 (± 0.12)

Values reported are the mean from triplicate (n=3) ± standard deviation

¹ANOVA test was not significant ($P > 0.05$)

²EXT = extensive grazing system; SEMI = semi-intensive grazing system

Table 2. Bacterial composition in teat skin and dairy product samples

	Teat skin (n=12)	Raw milk (n=12)	Cheese core (n=12)	Cheese rind (n=12)
<i>Firmicutes</i>	56.5%	41.3%	99.8%	73.3%
<i>Actinobacteria</i>	39.5%	30.7%	0.02%	26.5%
<i>Proteobacteria</i>	4.02%	27.1%	0.10%	0.18%
<i>Bacteroidetes</i>	-	0.96%	<0.01%	<0.01%
<i>Fusobacteria</i>	-	-	0.05%	<0.01%
Total OTU number	300	112	43	75
OTUs > 1%	Romboutsia sp. (OTU3, 14.6%), B. pseudolongum (OTU6, 7.31%), Intestinibacter sp. (OTU7, 6.42%), Corynebacterium sp. (OTU8, 5.87%), Turicibacter sp. (OTU9, 5.59%), Peptoclostridium sp. (OTU10, 5.58%), Corynebacterium sp. (OTU12, 3.62%), Staphylococcus sp. (OTU16, 2.37%), Corynebacterium sp. (OTU17, 1.69%), Jeotgalicoccus sp. (OTU34, 1.39%), Corynebacterium sp. (OTU20, 1.37%), Corynebacterium sp. (OTU21, 1.36%), Dietzia sp. (OTU19, 1.34%), Corynebacterium sp. (OTU22, 1.28%), Aerococcus sp. (OTU26, 1.21%), C. pseudotuberculosis (OTU23, 1.17%), Corynebacterium sp. (OTU25, 1.12%), Bacillus sp. (OTU29, 1.03%)	Sphingomonas sp. (OTU14, 19.4%), Bifidobacterium sp. (OTU18, 14.2%), Bacillus sp. (OTU24, 9.65%), L. lactis (OTU1, 8.19%), Rhodococcus sp. (OTU33, 6.56%), Lactobacillus sp. (OTU13, 6.03%), Rombustia sp. (OTU3, 2.20%), Streptococcus sp. (OTU53, 2.18%), C. gilardii (OTU98, 2.04%), Brevundimonas sp. (OTU103, 1.94%), Rhodococcus sp. (OTU100, 1.84%), L. helveticus (OTU27, 1.82%), Turicibacter sp. (OTU9, 1.72%), Dietzia sp. (OTU19, 1.63%), Corynebacterium sp. (OTU17, 1.54%), Pseudomonas sp. (OTU104, 1.29%), B. mongoliense (OTU159, 1.01%)	<i>L. lactis</i> (OTU1, 97.4%)	<i>L. lactis</i> (OTU1, 69.7%), <i>Brevibacterium sp.</i> (OTU4, 12.8%), <i>Nocardiosis sp.</i> (OTU5, 6.65%), <i>B.linens</i> (OTU11, 1.87%), <i>Brachybacterium sp.</i> (OTU15, 1.22%)

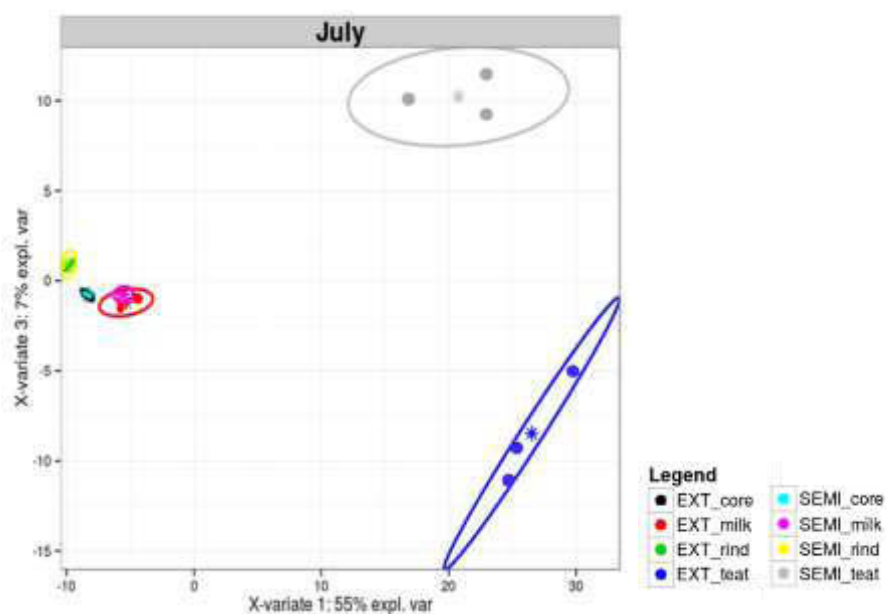
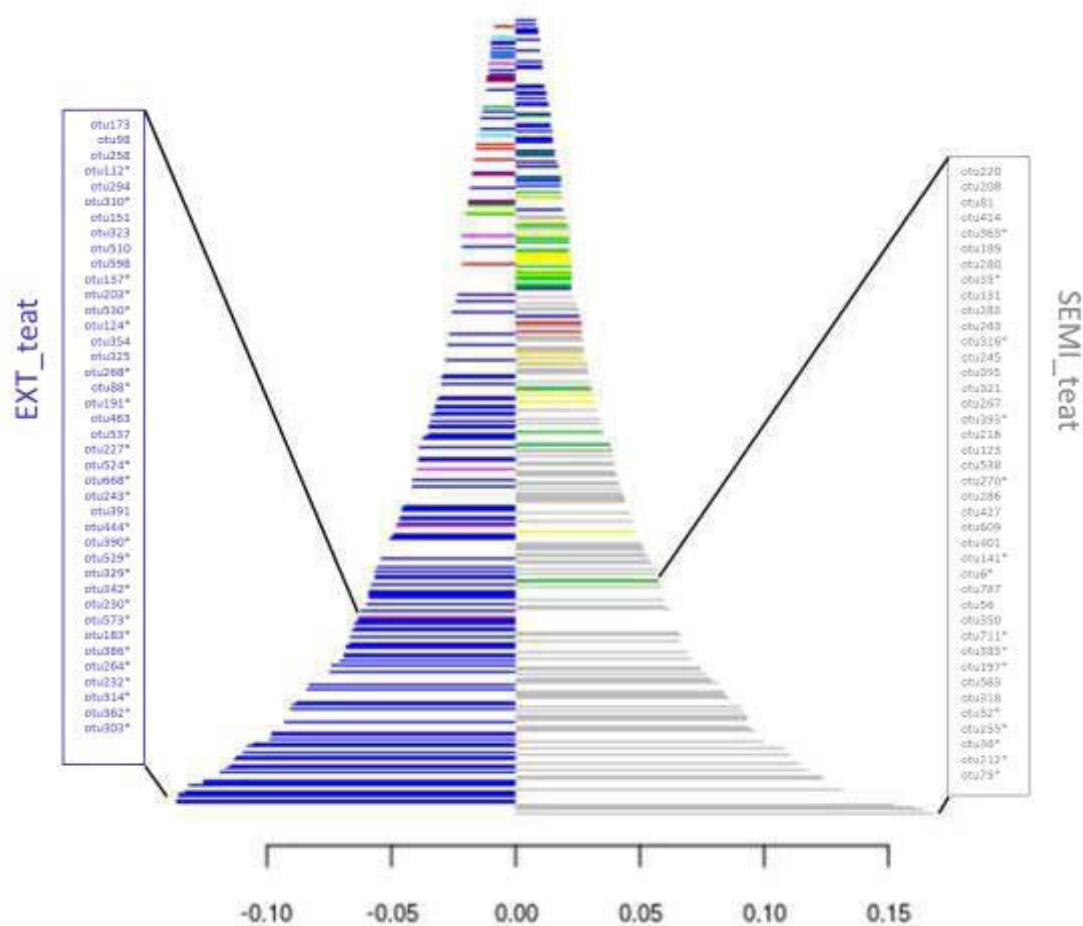
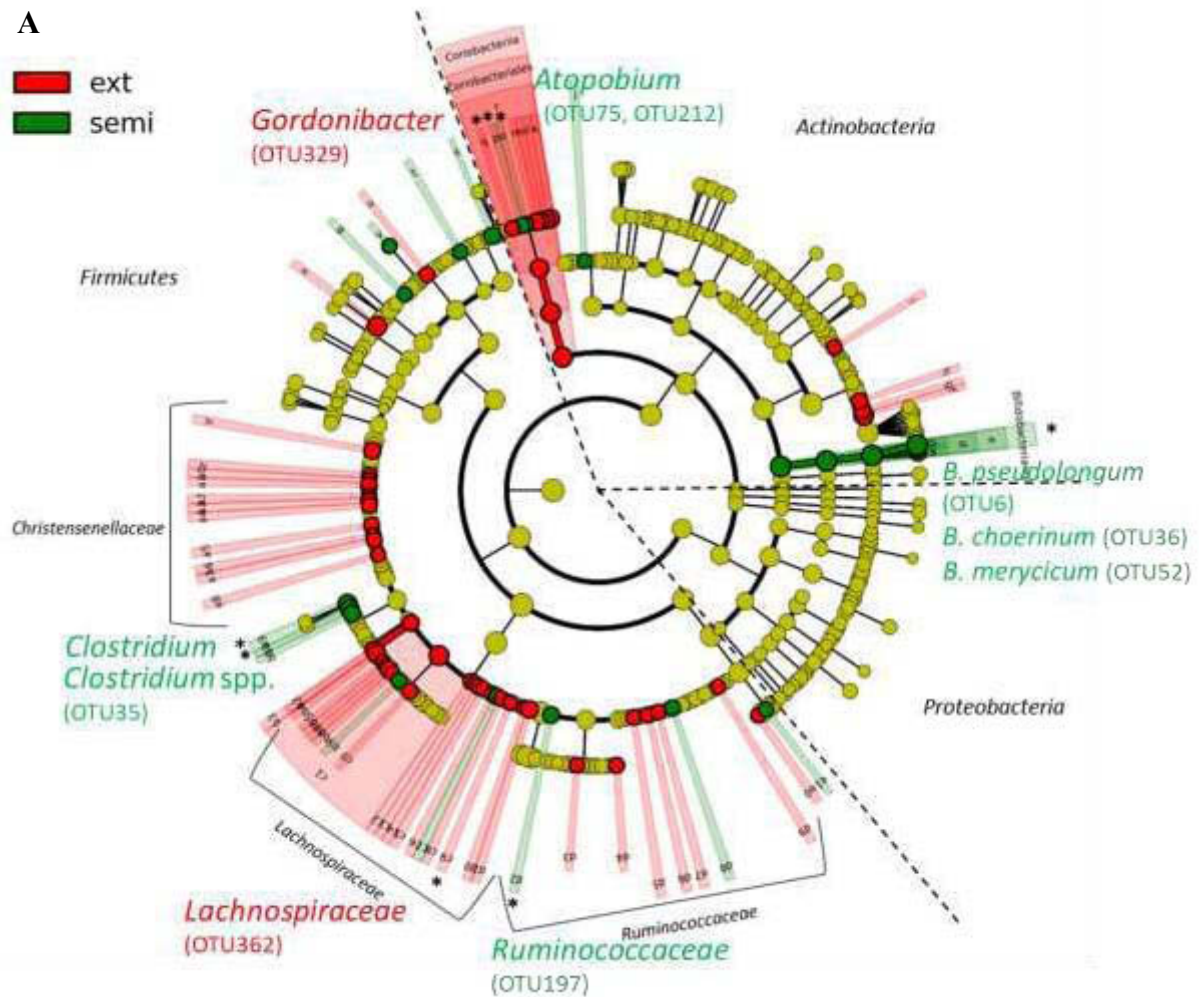
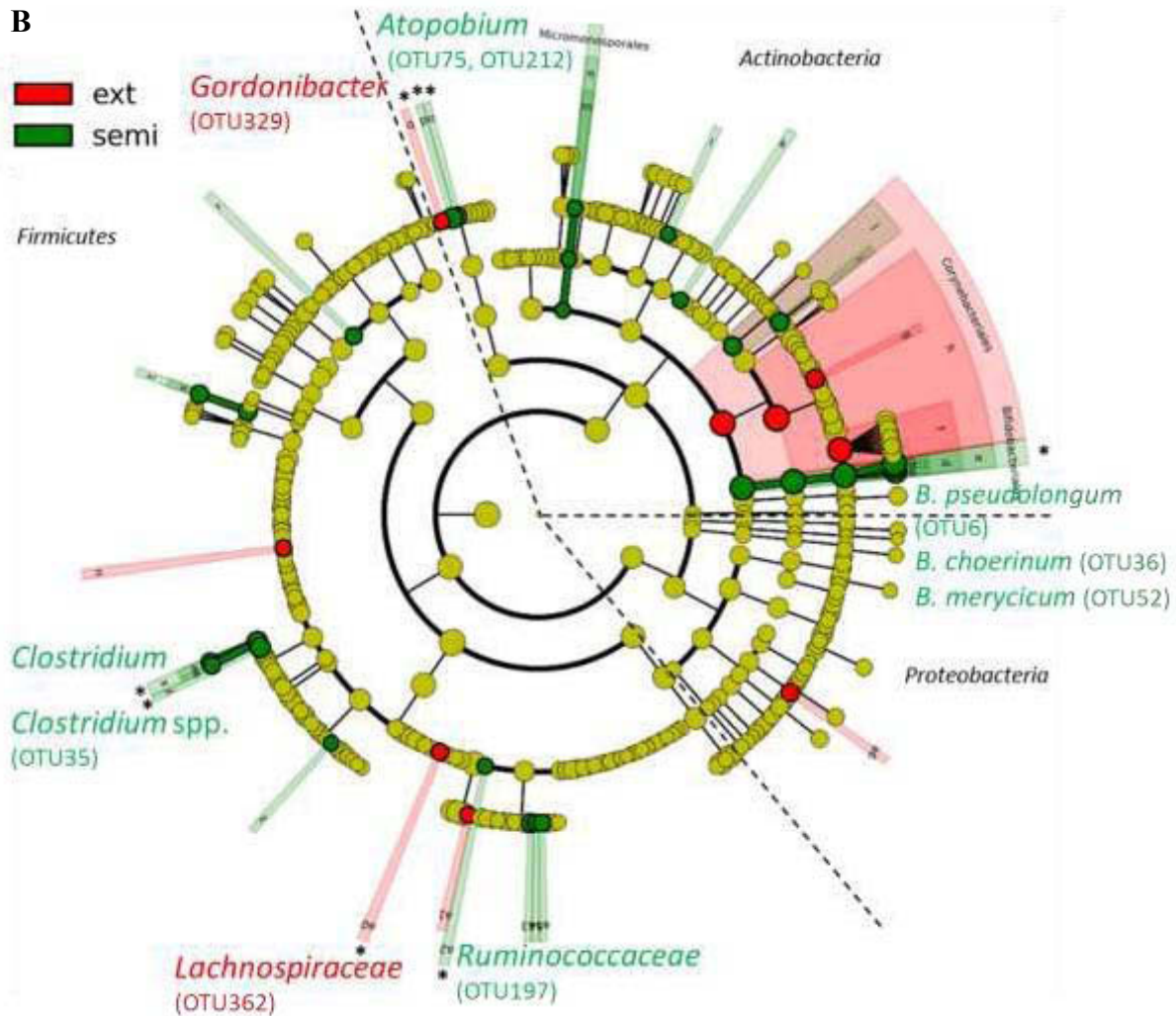
A**B**

Figure 1. Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) performed on the relative abundance of 365 OTUs found in 24 samples of teat skin and dairy products (milk, cheese core, and cheese rind) from EXT and SEMI grazing systems in July. **A)** Plot of sample distribution is projected on principal components (PC) 1 and 3. **B)** Contribution of 365 variables to PC3. The 84 OTUs that contribute the most to PC3 were reported. The symbol * indicates the OTUs with a differential abundance using LefSe.

A



a: *Bifidobacterium choerinum* (OTU36); b: *Bifidobacterium merycicum* (OTU52); c: *Bifidobacterium pseudolongum* (OTU6); d: *Bifidobacterium*(g); e: *Bifidobacteriaceae*(f); f: *Corynebacterium* spp. (OTU12); g: *Corynebacterium* (OTU137); h: *Corynebacterium* (OTU183); i: *Corynebacterium* (OTU444); j: *Nocardiodaceae* (OTU363); k: *Atopobium*(g); l: *Atopobium* (OTU112); m: *Atopobium* (OTU124); n: *Atopobium* (OTU130); o: *Atopobium* (OTU212); p: *Atopobium* (OTU75); q: *Gordonibacter* (OTU329); r: *Coriobacteriaceae*(f); s: *Bacillus* (OTU141); t: *Paenibacillus* spp. (OTU359); u: *Solibacillus* (OTU205); v: *Sporosarcina globispora* (OTU316); w: *Sporosarcina* (OTU393); x: *Aerococcus*(g); y: *Christensenellaceae* (OTU146); z: *Christensenellaceae* (OTU193); a0: *Christensenellaceae* (OTU227); a1: *Christensenellaceae* (OTU258); a2: *Christensenellaceae* (OTU268); a3: *Christensenellaceae* (OTU285); a4: *Christensenellaceae* (OTU303); a5: *Christensenellaceae* (OTU390); a6: *Christensenellaceae* (OTU398); a7: *Christensenellaceae* (OTU402); a8: *Christensenellaceae* (OTU530); a9: *Clostridium*(g); b0: *Clostridium* spp. (OTU35); b1: *Clostridium* (OTU85); b2: *Mogibacterium* (OTU135); b3: *Family XIII*(f); b4: *Acetitomaculum*(g); b5: *Acetitomaculum* (OTU264); b6: *Acetitomaculum* (OTU314); b7: *Acetitomaculum* (OTU37); b8: *Acetitomaculum* (OTU573); b9: *Cellulosilyticum* (OTU270); c0: *Coprococcus* (OTU191); c1: *Lachnospiraceae*(f); c2: *Lachnospiraceae* (OTU156); c3: *Lachnospiraceae* (OTU181); c4: *Lachnospiraceae* (OTU203); c5: *Lachnospiraceae* (OTU232); c6: *Lachnospiraceae* (OTU243); c7: *Lachnospiraceae* (OTU255); c8: *Lachnospiraceae* (OTU313); c9: *Lachnospiraceae* (OTU362); d0: *Lachnospiraceae* (OTU529); d1: *Lachnospiraceae* (OTU88); d2: *Ruminococcaceae* (OTU197); d3: *Ruminoclostridium* (OTU524); d4: *Saccharofermentans* (OTU356); d5: *Ruminococcaceae* (OTU230); d6: *Ruminococcaceae* (OTU310); d7: *Ruminococcaceae* (OTU342); d8: *Ruminococcaceae* (OTU383); d9: *Ruminococcaceae* (OTU668); e0: *Solobacterium* (OTU386); e1: *Turicibacter* (OTU711). (f): family; (g): genus.



a: *Bifidobacterium choerinum* (OTU36); b: *Bifidobacterium merycicum* (OTU52); c: *Bifidobacterium pseudolongum* (OTU6); d: *Bifidobacterium*(g); e: *Bifidobacteriaceae*(f); f: *Corynebacterium*(g); g: *Corynebacterium* (OTU260); h: *Corynebacteriaceae*(f); i: *Rhodococcus*(g); j: *Nocardiaceae*(f); k: *Dermatophilaceae* (OTU281); l: *Agreia* (OTU335); m: *Micromonospora* (OTU379); n: *Micromonosporaceae*(f); o: *Atopobium* (OTU212); p: *Atopobium* (OTU75); q: *Gordonibacter* (OTU329); r: *Planococcaceae* (OTU302); s: *Lactococcus lactis* (OTU1); t: *Lactococcus*(g); u: *Christensenellaceae* (OTU370); v: *Clostridium chartababidum* (OTU321); w: *Clostridium hylemonae* (OTU271); x: *Clostridium*(g); y: *Clostridium* spp. (OTU35); z: *Coprococcus* (OTU248); a0: *Lachnospiraceae* (OTU362); a1: *Terrisporobacter* (OTU357); a2: *Ruminococcaceae* (OTU197); a3: *Ruminococcus* (OTU216); a4: *Ruminococcus* (OTU322); a5: *Ruminococcus* (OTU334); a6: *Aminobacter* (OTU169). (f): family; (g): genus.

Figure 2. LefSe cladogram demonstrating taxonomic differences in cow teat skin microbiota between the two grazing systems (EXT and SEMI) **(A)** in July, and **(B)** in September. Taxa and nodes highlighted in red and green were significantly more abundant in EXT and SEMI systems, respectively. The diameter of each circle is proportional to the abundance of the taxon. Nodes remaining yellow indicate taxa that were not significantly differentially represented. The symbol * indicates identical taxa with a differential abundance at both periods.

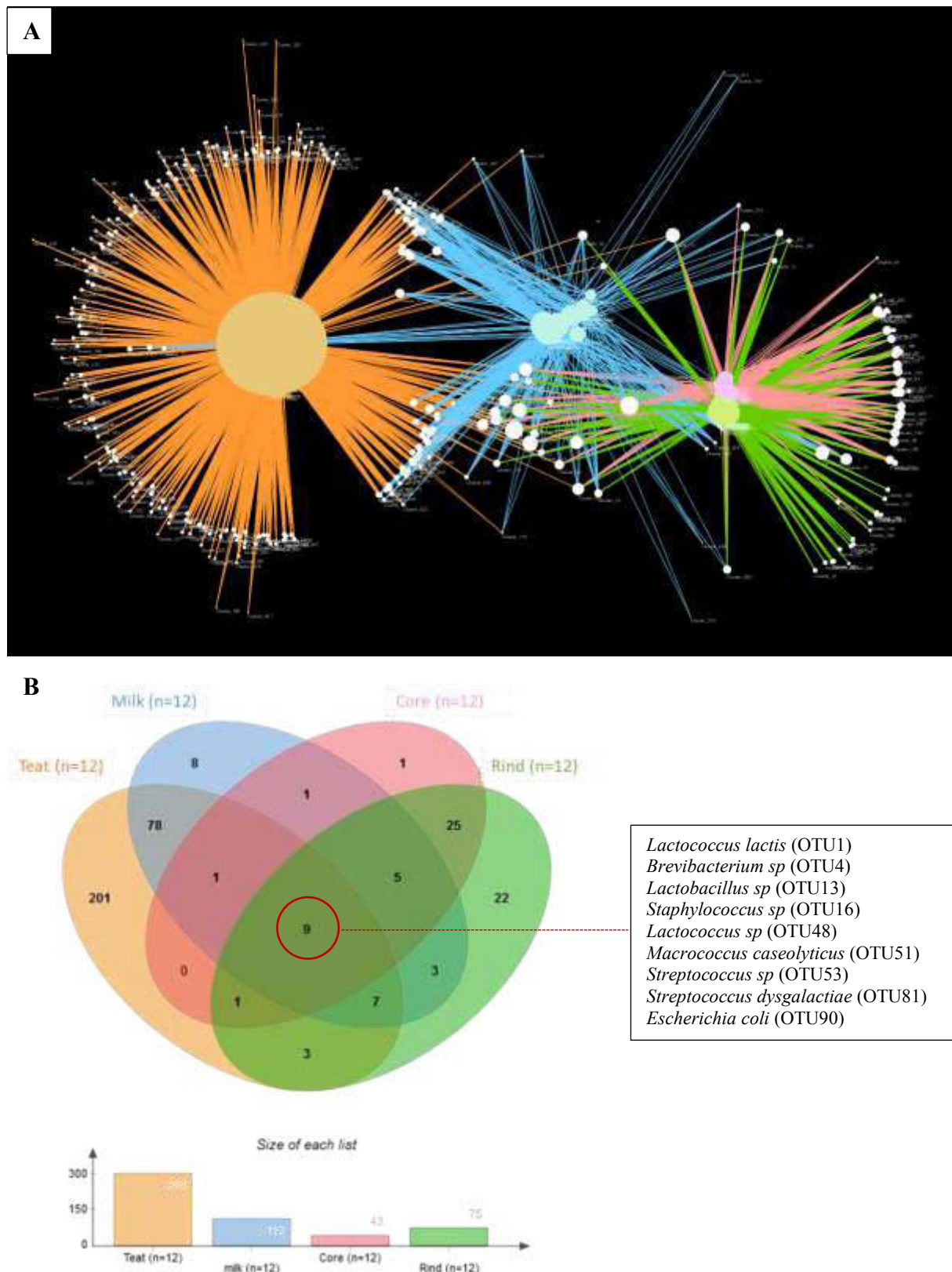


Figure 3. Occurrence of the 365 OTUs across the habitats from teat skin to ripened cheeses. The OTUs detected in at least two samples of the same habitat were conserved. In each figure, the teat skin samples were coloured in orange, raw milk samples in blue, cheese core samples in pink, and cheese rind samples in green. **A)** Network analysis. The nodes correspond to OTUs (white) and samples. The node size is proportional to the number of the edges (lines connecting the nodes). **B)** Venn diagram

Effet de la matière grasse laitière sur la dynamique des communautés bactériennes et fongiques au cours de l'affinage des fromages, et leur interaction sur les caractéristiques sensorielles des fromages

Le but de cette dernière partie était d'explorer l'effet de la matière grasse laitière sur la dynamique des communautés bactériennes et fongiques au cours de l'affinage des fromages, et leur interaction sur les caractéristiques sensorielles des fromages. Pour cela, des fromages de type Cantal ont été fabriqués à partir du même lait écrémé de composition microbiologique et biochimique identique et de deux crèmes avec une composition en acides gras différente. Pour étudier les équilibres microbiens sur la croûte des fromages au cours de l'affinage, l'approche « metabarcoding » a été employée.

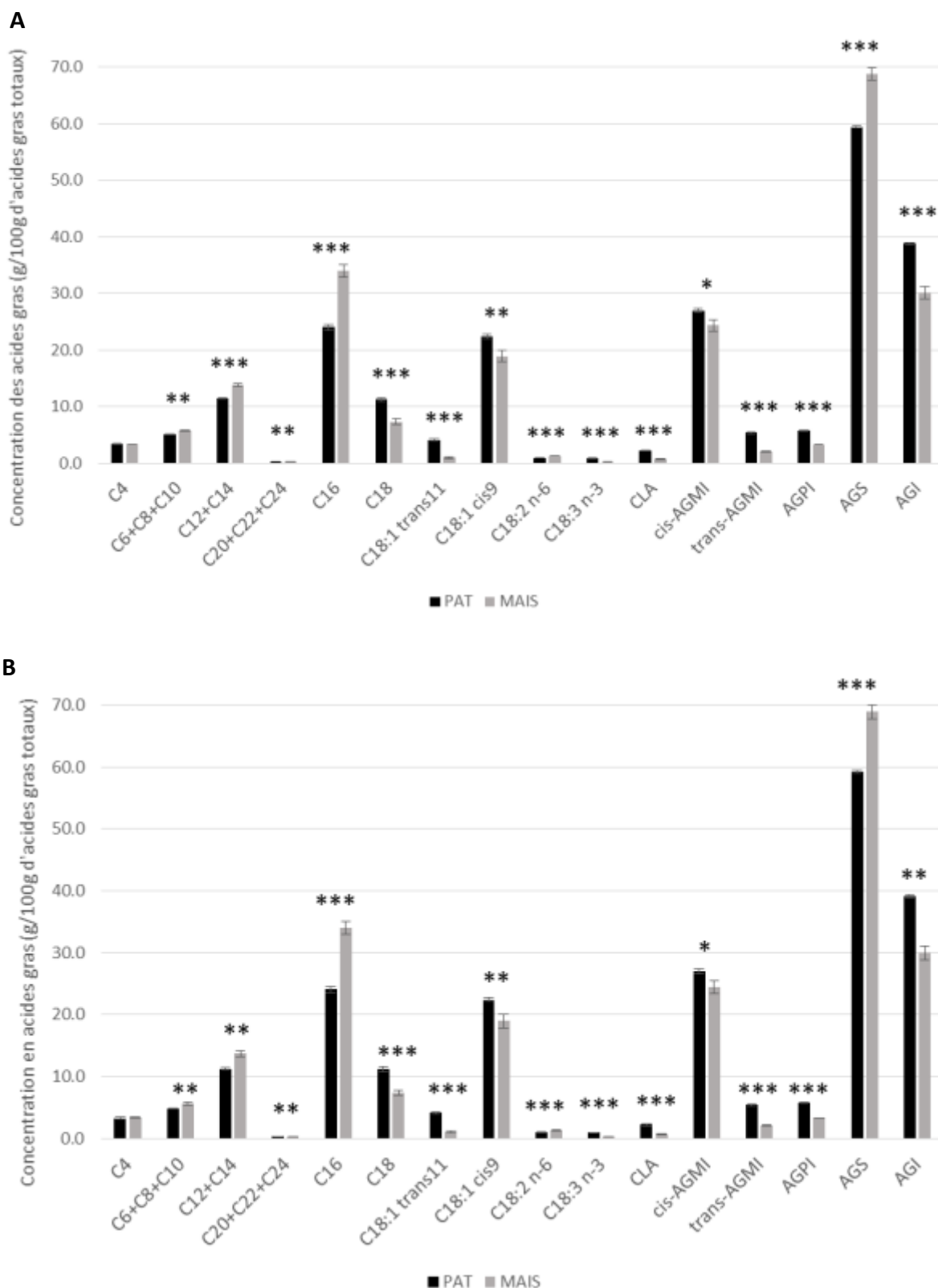


Figure 17. Composition en acides gras des laits crus (A) et pasteurisés (B) utilisés pour la fabrication des fromages au lait cru et au lait pasteurisé. L'effet de l'origine de la crème a été déterminé par un test de Student : *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,1$.

La composition en acides gras des groupes CLA¹, cis-AGMI², trans-AGMI³, AGPI⁴, AGS⁵ et AGI⁶ est indiquée dans les données supplémentaires.

1. Résultats

1.1. Effets d'une modification de la composition de la matière grasse laitière sur les composantes biochimique, microbiologique et sensorielle des laits aux fromages

1.1.1. Laits crus et pasteurisés

Pour chaque traitement du lait étudié (cru *versus* pasteurisé), le profil en acides gras des laits était significativement différent selon l'origine de la crème (PAT *versus* MAIS) (**Figure 17**). Les laits avec une crème PAT étaient plus riches en acides gras insaturés (AGI) que les laits avec une crème MAIS ($P < 0,01$; respectivement 38,9 et 30,2 g/100g d'acides gras totaux pour les laits crus ; respectivement 39,1 et 30,0 g/100g d'acides gras totaux pour les laits pasteurisés). De plus, les laits MAIS étaient plus riches en acides gras saturés (AGS) que les laits PAT ($P < 0,001$; respectivement 68,8 et 59,5 g/100g d'acides gras totaux pour les laits crus ; respectivement 68,9 et 59,2 g/100g d'acides gras totaux pour les laits pasteurisés). Les concentrations en acides gras saturés à longue chaîne (C20 à C22), en acide stéarique (C18:0), en acide vaccénique (C18:1*trans*11), en acide oléique (C18:1*cis*9), en acide linoléique (C18:2*n-3*), en acides linoléiques conjugués (CLA), en acides gras mono-insaturés (*cis*-AGMI et *trans*-AGMI) et en acides polyinsaturés (AGPI) étaient plus élevées dans les laits PAT alors que les concentrations en AGS à chaîne courte et moyenne (C6:0 à C14:0) et en acide palmitique (C16:0) étaient plus faibles comparées aux laits MAIS. Le rapport C18:1*cis*9/C16:0 était plus élevé dans les laits PAT que dans les laits MAIS (respectivement, 0,93 et 0,56 pour les laits crus ; 0,96 et 0,55 pour les laits pasteurisés). De façon logique, la teneur des laits en protéine et caséine, en matière grasse, en calcium et phosphore ainsi que le niveau des principaux groupes microbiens des laits crus et pasteurisés n'était pas différent selon l'origine de la crème (**Tableau 4**). La couleur des laits PAT est significativement moins rouge et plus jaune que celle des laits MAIS.

1.1.2. Fromages au lait cru et au lait pasteurisé

Comme pour les laits, le profil en acides gras de la croûte et de la pâte des fromages au lait cru et au lait pasteurisé était toujours significativement différent selon l'origine de la crème (**Tableaux 5 et 6** ; données non montrées pour la pâte des fromages au lait pasteurisé). De manière générale, les fromages PAT étaient plus riches en AGI et plus pauvres en AGS que les fromages MAIS. En revanche, la composition chimique globale (matière sèche, gras/sec, calcium, phosphore et chlorures), le pH, la protéolyse des fromages au lait cru et au lait pasteurisé n'ont pas varié significativement selon l'origine de la crème (**Tableau 7, S1 et S2**). La force de déformation maximale pour les fromages PAT était plus faible que pour les fromages MAIS (-104 N/cm² pour les fromages au lait cru et -134 N/cm² pour les

Tableau 4. Composition globale et niveau des principaux groupes microbiens du lait de cuve selon l'origine de la crème

Item	Cru			Pasteurisé		
	PAT	MAIS	<i>pvalue</i>	PAT	MAIS	<i>pvalue</i>
Milk pH	6.58±0.01	6.56±0.02	0.189	6.63±0.01	6.61±0.02	0.189
Fat (g/L)	37.5±0.39	37.1±0.34	0.223	37.2±0.75	37.1±0.09	0.797
Protein (g/L)	35.2±0.20	35.0±0.15	0.315	34.9±0.90	34.8±0.92	0.966
Fat/protein ratio	1.07±0.01	1.06±0.01	0.422	1.07±0.03	1.06±0.03	0.897
Lactose (g/L)	49.6±0.15	49.6±0.17	0.814	48.9±0.10	48.9±0.15	0.768
Urea (mg/L)	425±15.0	426±2.89	0.859	433±5.77	436±5.77	0.519
Calcium (g/L)	1.42±0.03	1.41±0.01	0.607	1.44±0.06	1.51±0.07	0.267
Phosphorus (g/L)	0.94±0.01	0.95±0.02	0.778	0.91±0.02	0.90±0.02	0.374
Casein (g/L)	31.5±0.14	31.2±0.18	0.090	31.3±0.63	30.6±0.10	0.124
SCC ¹ (10 ³ CFU/mL)	127±47.9	130±17.6	0.924	123±10.1	128±11.9	0.586
<i>L</i> * (black-white)	80.4±0.26	81.0±0.35	0.102	82.1±0.22	82.4±0.18	0.147
<i>a</i> * (green-red)	-2.90±0.09	-2.46±0.09	0.004	-2.70±0.09	-2.54±0.07	<i>0.076</i>
<i>b</i> * (blue-yellow)	6.95±0.22	7.70±0.14	0.008	8.10±0.20	8.28±0.15	0.257
LPL activity (nmol/min/mL)	565±72.3	618±30.9	0.307	613±42.5	657±20.2	0.179
Milk fat globule size (µm)	3.62±0.13	3.57±0.12	0.519	3.60±0.08	3.57±0.13	0.725
Presumed microbial group (log UFC/mL)²						
Total mesophilic bacteria	3.73±0.51	3.80±0.45	0.860	2.40±0.60	2.83±0.53	0.402
Lactic acid bacteria	2.45±0.46	2.63±0.37	0.617	<1	<1	
Heterofermentative facultative <i>Lactobacillus</i>	1.75±0.26	1.73±0.38	0.943	<1	<1	
Gram-positive catalase-positive bacteria	2.38±0.21	2.34±0.58	0.916	<1	<1	
Gram-negative bacteria	2.28±0.78	2.19±0.86	0.904	<1	<1	
<i>Enterococcus</i>	2.51±0.45	2.65±0.41	0.705	<1	<1	

Values reported are the mean from triplicate milk samples (n=3) ± standard deviation.

pvalue are in bold when the statistical Student's t-Test when $P < 0.05$, and in italic when $0.05 < P < 0.10$.

¹ SCC = somatic cell counts

² <1 = below detection threshold

fromages au lait pasteurisé ; **Tableau 7**). Le niveau de lipolyse était plus élevé sur la croûte que dans la pâte des fromages (respectivement 22% et 0,6% en moyenne) et celui-ci ne variait pas significativement entre les fromages PAT et MAIS quel que soit le traitement du lait (**Figure 18 et Tableau 5**). Concernant le profil en acides gras libres sur la croûte des fromages, les teneurs en C18:0, CLA et C18:3n-3 étaient plus élevées pour les fromages PAT alors que les teneurs en C14:0 et C16:0 étaient plus faibles comparées aux fromages MAIS (**Tableau 5**). Au total, 132 composés volatils appartenant à 6 familles ont été identifiés: les aldéhydes (22), les alcools (24), les cétones (29), les esters (34), les composés soufrés (10), les furanes (11), et 2 composés n'appartenant à aucune de ces familles (le méthyl-benzène et le méthyl-thiocyanate). Sept de ces composés volatils étaient présents en concentrations significativement différentes en fonction de la nature de la matière grasse, à la fois dans les fromages au lait cru et au lait pasteurisé (**Tableaux 8 et S4**). Le pentanal, le 1-pentanol, 3-méthyl-2-pentanol, le 2-éthyl-hexyl acétate, le 2-éthyl-furane et le méthyl-benzène étaient plus abondants dans les fromages PAT alors que le 8-nonen-2-one était moins abondant comparé aux fromages MAIS. Sur la croûte et dans la pâte des fromages au lait cru et au lait pasteurisé, le niveau d'aucun groupe microbien n'était affecté par l'origine de la crème (**Tableaux 9 et 10** pour la pâte des fromages au lait cru et au lait pasteurisé ; **Tableau S3** pour la croûte des fromages au lait cru et au lait pasteurisé).

Dans les fromages au lait cru, il faut noter que les concentrations en C18:2n-6 et en acides gras mono-insaturés *cis* (*cis*-MUFA) ne différaient pas significativement entre la croûte des fromages au lait cru PAT et MAIS, contrairement à ce qui a été observé pour les laits crus. Au total, 10 autres composés volatils avaient une concentration significativement différente dans les fromages au lait cru selon l'origine de la crème (**Tableau 8 et S4**). Le butanal, l'heptanal (aldéhydes) et le 4-méthyl-2-pentanol (alcool) étaient plus abondants dans les fromages PAT alors que le méthanol, le 2-propanol, le 2-pentanol, le 2-heptanol (alcools), le méthyl butanoate, le méthyl hexanoate et le méthyl octanoate (esters) étaient moins abondants dans les fromages PAT comparés aux fromages MAIS. Le profil en acides gras volatils ne différait pas significativement selon l'origine de la crème pour les fromages au lait cru (**Tableau S45**).

Dans les fromages au lait pasteurisé, la teneur des acides gras libres insaturés (UFA) dont cis9-C18:1 était plus élevée sur la croûte des fromages PAT alors que celle des acides gras libres saturés (SFA) était plus faible comparée aux fromages MAIS (**Tableau 5**). L'activité de l'eau était plus élevée sur la croûte des fromages PAT que sur celle des fromages MAIS ($P=0,016$; respectivement 0,93 et 0,91 ; **Tableau 7**). La pâte des fromages PAT était plus brillante que celle des fromages MAIS ($P=0,046$; respectivement 77,1 et 76,4). Au total, 5 autres composés volatils avaient une concentration significativement différente dans les fromages au lait pasteurisé selon l'origine de la crème (**Tableaux**

Tableau 5. Profil en acides gras totaux et en acides gras libres sur la croûte des fromages en fin d'affinage (à 150 jours d'affinage) selon l'origine de la crème

	Cru			Pasteurisé		
	PAT	MAIS	pvalue	PAT	MAIS	pvalue
Total fatty acids (g/100g of FA)						
C4:0	2.22±0.11	2.37±0.52	0.646	2.18±0.48	2.39±0.16	0.514
C6:0+C8:0+C10:0	3.75±0.15	4.57±0.55	0.067	3.58±0.47	4.56±0.31	0.040
C12:0+C14:0	10.9±0.27	13.3±0.16	<0.001	10.7±0.31	13.4±0.32	<0.001
C16:0	26.8±0.60	37.0±2.69	0.003	26.7±1.37	37.1±0.55	<0.001
C18:0	13.0±0.51	8.32±0.23	<0.001	12.7±0.71	8.46±0.52	0.001
C20:0+C22:0+C24:0	0.34±0.01	0.27±0.03	0.009	0.37±0.03	0.28±0.03	0.011
cis9-C18:1	21.0±0.49	17.9±1.68	0.037	22.0±0.96	17.7±0.49	0.002
Σ other cis-C18:1 ⁷	1.08±0.02	0.90±0.07	0.013	1.10±0.04	0.91±0.04	0.004
trans11-C18:1	4.38±0.18	1.22±0.08	<0.001	4.00±0.11	1.27±0.16	<0.001
Σ other trans-C18:1 ⁸	0.98±0.03	0.68±0.01	<0.001	0.93±0.07	0.71±0.04	0.018
Σ CLA ¹	1.86±0.08	0.60±0.06	<0.001	1.75±0.10	0.61±0.06	<0.001
C18:3 n-3	0.74±0.06	0.24±0.03	<0.001	0.78±0.07	0.25±0.03	<0.001
C18:2 n-6	1.70±0.08	2.01±0.30	0.156	1.49±0.27	1.90±0.06	0.059
Σ cis-MUFA ²	24.9±0.51	22.5±2.08	0.127	26.2±1.19	22.2±0.40	0.006
Σ trans-MUFA ³	5.72±0.23	2.20±0.08	<0.001	5.17±0.29	2.29±0.20	<0.001
Σ PUFA ⁴	5.91±0.04	3.78±0.15	<0.001	5.65±0.04	3.69±0.17	<0.001
Σ SFA ⁵	62.1±0.30	70.6±1.95	0.002	61.6±0.93	70.9±0.69	<0.001
Σ UFA ⁶	37.8±0.36	29.2±2.02	0.002	38.2±0.99	28.8±0.75	<0.001
cis9-C18:1/C16:0	0.78±0.04	0.49±0.08	0.004	0.83±0.08	0.48±0.02	0.002
Free fatty acids (mg/100mg of fat)						
C4:0	2.41±0.08	2.90±0.34	0.073	3.18±0.82	3.70±0.66	0.439
C6:0	2.80±0.19	3.35±0.53	0.169	3.37±0.63	4.14±0.49	0.171
C8:0	1.72±0.14	1.92±0.31	0.365	1.84±0.34	2.18±0.21	0.204
C10:0	3.03±0.25	3.31±0.51	0.432	2.99±0.40	3.64±0.27	0.084
C12:0	2.92±0.18	3.21±0.31	0.253	2.85±0.27	3.33±0.19	0.066
C14:0	11.0±0.36	12.2±0.66	0.041	11.1±0.57	12.6±0.38	0.019
C16:0	34.8±0.40	42.4±1.28	<0.001	32.7±2.11	41.5±0.65	0.002
C18:0	14.2±0.92	8.23±0.77	<0.001	13.1±1.49	7.90±0.61	0.005
cis9-C18:1	12.7±0.68	9.85±2.63	0.142	14.6±1.43	9.34±1.45	0.011
C18:2n-6	0.66±0.04	0.78±0.13	0.204	0.71±0.01	0.74±0.08	0.591
CLA	0.59±0.09	0.20±0.02	0.002	0.67±0.08	0.20±0.05	<0.001
C18:3n-3	0.21±0.03	0.08±0.02	0.003	0.30±0.06	0.08±0.02	0.003
Σ SFA	79.0±0.48	83.0±2.91	0.077	77.5±1.50	84.3±1.59	0.006
Σ MUFA	15.8±0.64	13.4±3.02	0.256	17.8±1.40	12.6±1.40	0.010
Σ PUFA	1.40±0.03	1.18±0.18	0.109	1.52±0.09	1.13±0.14	0.016
Σ UFA	17.8±0.62	14.8±3.19	0.188	20.0±1.53	13.9±1.58	0.009
Total FFA (mg/100mg of DM)	8.17±0.20	7.39±1.51	0.466	9.91±0.46	9.30±1.08	0.412
Lipolysis (%)	20.6±2.40	17.6±5.87	0.468	26.1±4.56	23.7±5.42	0.597

Values reported are the mean from triplicate cheese rind samples (n=3) ± standard deviation.

pvalue are in bold when the statistical Student's t-Test when $P < 0.05$, and in italic when $0.05 < P < 0.10$.

Abbreviations are: FA: fatty acids; CLA: conjugated linoleic acid; LCPUFA: long-chain PUFA; MUFA: mono-unsaturated FA; PUFA: poly-unsaturated FA; SFA: saturated FA; UFA: unsaturated FA

¹⁻⁸ The detailed description of the sums of FA are reported in the supplementary information.

Tableau 6. Concentration en acides gras de la pâte des fromages selon l'origine de la crème au cours de l'affinage

Fatty acids (g/100g of FA)	Feed		Time					SEM	Effects and significance		
	PAT <i>n</i> =15	MAIS <i>n</i> =15	D3 <i>n</i> =6	D15 <i>n</i> =6	D30 <i>n</i> =6	D90 <i>n</i> =6	D150 <i>n</i> =6		F	T	F*T
C4:0	3.22	3.34	3.31	3.25	3.32	3.32	3.21	0.017	*	**	•
C6:0+C8:0+C10:0	4.95	5.70	5.33	5.31	5.35	5.35	5.30	0.073	**	ns	ns
C12:0+C14:0	11.6	13.8	12.7	12.7	12.7	12.7	12.8	0.208	***	•	ns
C16:0	24.2	33.9	29.0	29.1	28.9	29.2	29.1	0.907	***	*	ns
C18:0	11.1	7.37	9.22	9.24	9.24	9.20	9.23	0.351	***	ns	•
C20:0+C22:0+C24:0	0.28	0.22	0.24	0.25	0.25	0.25	0.25	0.006	*	*	ns
<i>cis</i> 9-C18:1	22.6	19.1	20.8	20.8	20.9	20.9	20.8	0.348	**	ns	ns
Σ other <i>cis</i> -C18:1 ⁷	1.01	0.92	1.02	1.00	0.91	0.90	1.00	0.029	ns	ns	ns
<i>trans</i> 11-C18:1	4.00	1.16	2.49	2.53	2.66	2.62	2.59	0.266	***	ns	ns
Σ other <i>trans</i> -C18:1 ⁸	0.98	0.68	0.94	0.89	0.80	0.77	0.74	0.046	**	ns	ns
Σ CLA ¹	2.22	0.70	1.46	1.46	1.47	1.44	1.47	0.142	***	*	ns
C18:3n-3	0.91	0.28	0.59	0.59	0.61	0.59	0.60	0.324	***	•	ns
C18:2 n-6	0.88	1.31	0.97	1.12	1.12	1.13	1.13	0.049	**	ns	ns
Σ <i>cis</i> -MUFA ²	27.1	24.6	25.8	25.9	25.8	25.7	25.8	0.259	*	•	ns
Σ <i>trans</i> -MUFA ³	5.29	2.13	3.72	3.71	3.75	3.68	3.69	0.295	***	*	ns
Σ PUFA ⁴	5.75	3.31	4.40	4.56	4.57	4.53	4.59	0.228	***	ns	ns
Σ SFA ⁵	60.3	69.0	64.5	64.6	64.6	64.7	64.6	0.817	***	•	ns
Σ UFA ⁶	39.6	30.8	35.1	35.2	35.3	35.0	35.2	0.826	***	ns	ns
<i>cis</i> 9-C18:1/C16:0	0.93	0.56	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.035	***	ns	ns

Abbreviations are: D3: curd at placing in cellular; D15: 15 days of ripening; D30: 30 days of ripening; D90: 90 days of ripening; D150: 150 days of ripening; F: cow feeding; T: time of ripening; FA: fatty acids; CLA: conjugated linoleic acid; LCPUFA: long-chain PUFA; MUFA: mono-unsaturated FA; PUFA: poly-unsaturated FA; SFA: saturated FA; UFA: unsaturated FA.

• $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = not significant

¹⁻⁸ The detailed description of the sums of FA are reported in the supplementary information.

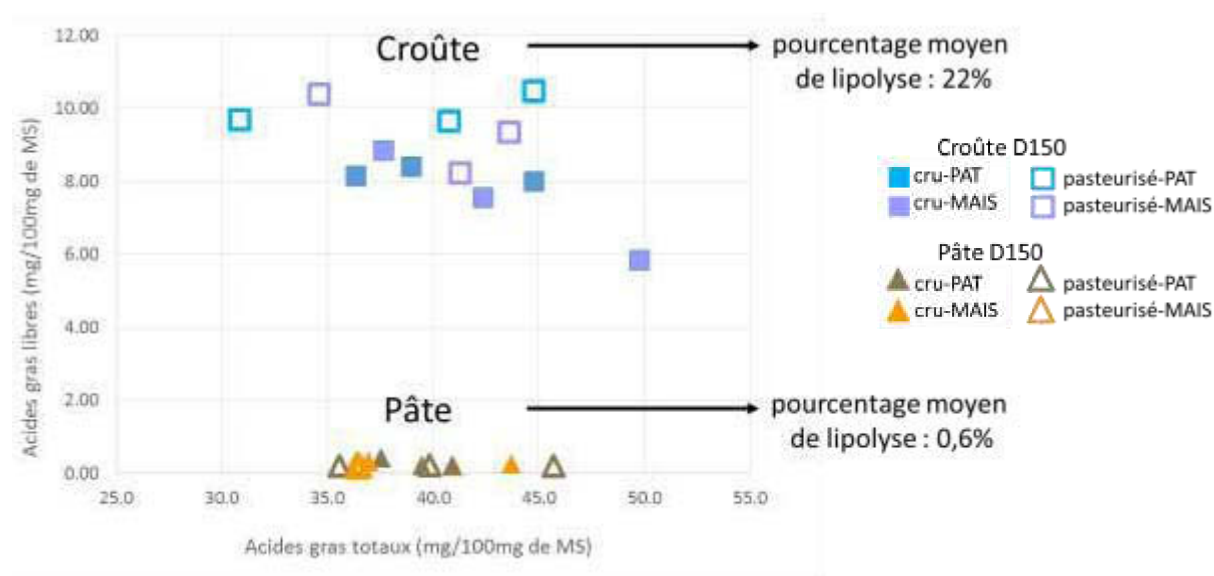
**Figure 18.** Niveau de lipolyse dans la pâte et la croûte des fromages au lait cru et au lait pasteurisé en fin d'affinage (à 150 jours d'affinage)

Tableau 7. Composition globale, rhéologie et couleur des fromages selon l'origine de la crème

Parameters	Cru			Pasteurisé		
	PAT	MAIS	pvalue	PAT	MAIS	pvalue
DM (%)	58.1±0.18	59.9±1.38	0.152	58.8±2.29	59.2±0.53	0.793
Fat (%)	30.9±0.58	30.3±1.09	0.402	28.5±0.87	29.3±0.75	0.320
Fat in DM (%)	53.2±0.95	50.5±1.90	<i>0.098</i>	48.5±2.26	49.4±1.48	0.587
pH	5.51±0.02	5.49±0.01	0.387	5.41±0.01	5.44±0.05	0.346
Calcium (%)	0.69±0.01	0.70±0.03	0.561	0.67±0.01	0.71±0.03	0.164
Phosphorus (%)	0.52±0.01	0.53±0.02	0.566	0.53±0.01	0.55±0.03	0.296
Chlorides (g NaCl/100g)	2.15±0.05	2.22±0.15	0.512	2.05±0.30	2.20±0.05	0.447
Aw core	0.95±0.00	0.95±0.01	0.423	0.95±0.01	0.95±0.00	0.678
Aw rind	0.93±0.00	0.91±0.01	<i>0.074</i>	0.93±0.01	0.91±0.01	0.016
Rheology						
strength to 10% of deformation (N/cm ²)	1.66±0.18	1.96±0.08	<i>0.060</i>	1.72±0.32	2.11±0.24	0.169
strength to 20% of deformation (N/cm ²)	3.53±0.42	4.94±0.88	<i>0.067</i>	3.91±1.08	5.52±0.36	<i>0.069</i>
strength to 30% of deformation (N/cm ²)	5.57±0.50	7.72±1.48	<i>0.076</i>	6.15±1.62	8.65±0.24	<i>0.057</i>
strength to 40% of deformation (N/cm ²)	7.76±0.54	10.6±2.09	<i>0.084</i>	8.16±1.79	11.8±0.10	0.024
strength to 50% of deformation (N/cm ²)	8.80±0.39	12.8±2.39	0.046	8.43±1.35	13.9±0.40	0.002
strength to 60% of deformation (N/cm ²)	9.21±0.45	13.6±2.47	0.038	9.09±1.61	14.8±0.68	0.005
strength to max deformation (N/cm ²)	305±27.0	409±55.0	0.042	321±39.1	455±10.0	0.004
young modulus	0.20±0.01	0.28±0.05	<i>0.056</i>	0.18±0.02	0.30±0.03	0.003
Colour						
L* (black-white)	77.4±0.89	79.0±1.77	0.257	77.1±0.06	76.4±0.28	0.046
a* (green-red)	1.95±0.14	2.20±0.22	0.168	1.85±0.14	1.79±0.13	0.661
b* (blue-yellow)	22.8±0.58	23.4±0.62	0.260	22.3±1.55	22.7±0.14	0.701

Values reported are the mean from triplicate cheese samples (n=3) ± standard deviation.

pvalue are in bold when the statistical Student's t-Test when $P < 0.05$, and in italic when $0.05 < P < 0.10$.

Abbreviations are: DM: dry matter; LPL: lipoprotein lipase; Aw: activity of water.

Tableau 8. Composés volatils identifiés dans les fromages pour lesquels l'origine de la crème a eu un effet significatif ($P < 0,05$)

N	Compounds	RI ¹	Cru	Pasteurisé
Aldehydes (22)				
1	acetaldehyde			PAT>MAIS **
2	butanal	597	PAT>MAIS *	
3	pentanal	702	PAT>MAIS *	PAT>MAIS **
5	heptanal	906	PAT>MAIS **	
Alcohols (24)				
23	methanol		PAT<MAIS *	
27	1-pentanol	771	PAT>MAIS *	PAT>MAIS ***
33	2-propanol	507	PAT<MAIS **	
35	2-pentanol	704	PAT<MAIS **	
36	2-heptanol	903	PAT<MAIS *	
44	4-methyl-2-pentanol	762	PAT>MAIS *	
46	3-methyl-2-pentanol	795	PAT>MAIS *	PAT>MAIS ***
Ketones (29)				
47	2-propanone	500		PAT<MAIS *
48	2-butanone	604		PAT<MAIS **
49	2-pentanone	691		PAT<MAIS *
51	2-hexanone	794		PAT<MAIS **
62	8-nonen-2-one	1089	PAT<MAIS *	PAT<MAIS ***
Esters (34)				
77	methyl butanoate	726	PAT<MAIS ***	
78	methyl hexanoate	928	PAT<MAIS **	
80	methyl octanoate	1129	PAT<MAIS *	
109	2-ethyl-hexyl acetate	1155	PAT>MAIS *	PAT>MAIS ***
Furan compounds (11)				
122	2-ethyl-furan	706	PAT>MAIS *	PAT>MAIS *
Others				
131	methyl-benzene	773	PAT>MAIS ***	PAT>MAIS **

¹ retention indices* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

Tableau 9. Niveau de population des principaux groupes microbiens dans la pâte des fromages au lait cru selon l'origine de la crème au cours de l'affinage

Presumed microbial group (log UFC/g)	Feed		Time						SEM	Effects and significance		
	PAT <i>n</i> =18	MAIS <i>n</i> =18	D2 <i>n</i> =6	D3 <i>n</i> =6	D15 <i>n</i> =6	D30 <i>n</i> =6	D90 <i>n</i> =6	D150 <i>n</i> =6		F	T	F*T
Total mesophilic bacteria	8.21	8.09	8.03	8.48	8.44	8.40	7.98	7.55	0.063	ns	***	ns
Lactic acid bacteria	7.94	7.86	7.91	8.42	8.38	7.93	7.79	6.96	0.087	ns	***	ns
Heterofermentative facultative <i>Lactobacillus</i>	5.89	5.86	3.10	4.27	5.62	7.16	7.75	7.36	0.294	ns	***	ns
Gram-positive catalase-positive bacteria	6.25	6.07	5.88	4.53	6.34	6.51	6.93	6.78	0.149	ns	***	ns
Gram-negative bacteria	6.17	5.96	5.98	5.90	6.16	6.29	nd	6.00	0.071	ns	•	ns
<i>Pseudomonas</i>	6.53	6.47	6.48	6.49	6.37	6.62	nd	6.56	0.045	ns	ns	ns
<i>Enterococcus</i>	6.80	6.77	6.26	6.80	6.93	6.95	6.93	6.86	0.073	ns	***	ns
<i>Enterobacteriaceae</i>	4.61	4.21	4.64	4.13	nd	4.80	4.05	nd	0.181	ns	ns	ns
Yeast	2.80	3.43	<1	<1	<1	3.30	3.29	2.75	0.214	ns	*	ns

Abbreviations are: D2: pounded curd; D3: curd at placing in cellular; D15: 15 days of ripening; D30: 30 days of ripening; D90: 90 days of ripening; D150: 150 days of ripening; F: cow feeding; T: time of ripening

• $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = not significant

nd = non determined

<1 = below detection threshold

Tableau 10. Niveau de population des principaux groupes microbiens dans la pâte des fromages au lait pasteurisé selon l'origine de la crème au cours de l'affinage

Presumed microbial group (log UFC/g)	Feed		Time						SEM	Effects and significance		
	PAT <i>n</i> =18	MAIS <i>n</i> =18	D2 <i>n</i> =6	D3 <i>n</i> =6	D15 <i>n</i> =6	D30 <i>n</i> =6	D90 <i>n</i> =6	D150 <i>n</i> =6		F	T	F*T
Total mesophilic bacteria	7.57	7.61	7.72	8.28	8.11	7.71	7.00	6.73	0.099	ns	***	ns
Lactic acid bacteria	7.16	7.38	7.66	8.25	7.79	7.02	7.04	5.85	0.144	ns	***	ns
Gram-positive catalase-positive bacteria	4.69	4.65	4.80	3.49	4.16	4.57	5.24	5.75	0.170	ns	**	ns
Gram-negative bacteria	6.10	5.89	5.95	5.51	6.08	nd	nd	6.46	0.096	ns	***	ns
<i>Pseudomonas</i>	6.68	6.59	6.64	6.88	6.51	nd	nd	6.52	0.044	ns	**	ns
<i>Enterococcus</i>	3.82	4.27	3.66	3.85	4.25	4.11	4.38	4.03	0.088	ns	**	ns
<i>Enterobacteriaceae</i>	5.22	3.89	5.37	3.74	<1	<1	<1	<1	0.390	•	**	ns

Abbreviations are: D2: pounded curd; D3: curd at placing in cellular; D15: 15 days of ripening; D30: 30 days of ripening; D90: 90 days of ripening; D150: 150 days of ripening; F: cow feeding; T: time of ripening

• $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = not significant

nd = non determined

<1 = below detection threshold

8 et S4). L'acétaldéhyde (aldéhyde) était plus abondant dans les fromages PAT alors que le 2-propanone, le 2-butanone, le 2-pentanone et le 2-hexanone (cétones) étaient moins abondants dans les fromages PAT comparés aux fromages MAIS. Les concentrations en acides isobutyrique (*isoC4*) et en acide isovalérique volatiles (*isoC5*) étaient significativement moins élevées (respectivement, $P=0,027$ et $P=0,039$) dans les fromages PAT que dans les fromages MAIS (**Tableau S4**).

Au cours de l'affinage des fromages au lait cru et au lait pasteurisé et quelle que soit l'origine de la matière grasse, les concentrations en acides butyrique (C4:0) et palmitique (C16:0), en AGS à longue chaîne, en CLA et en *trans*-MUFA variaient légèrement dans la pâte des fromages (**Tableau 6** ; données non montrés pour les fromages au lait pasteurisé). La protéolyse primaire et la protéolyse secondaire étaient significativement plus élevées dans les fromages à D150 qu'à D90 pour chaque traitement du lait étudié (**Tableau S1 et Tableau S2**). Le niveau le plus élevé de la « flore totale » y compris le niveau de bactéries lactiques a été observé à D3 (approximativement 10^8 CFU/g) dans les fromages au lait cru et au lait pasteurisé (**Tableau 9 et Tableau 10**). Le niveau en *Enterococcus* était le plus élevé entre D15 et D90 dans les fromages au lait cru (approximativement 10^7 CFU/g) et il était plus élevé à D90 dans les fromages au lait pasteurisé (approximativement 10^4 CFU/g). Le niveau de bactéries à Gram positif et catalase positive était plus élevé à D90 dans les fromages au lait cru (approximativement 10^7 CFU/g) alors qu'il était plus élevé à D150 dans les fromages au lait pasteurisé (approximativement 10^5 - 10^6 CFU/g). Dans les fromages au lait cru, le niveau de levures était plus élevé entre D30 et D90 (approximativement 10^3 CFU/g ; **Tableau 9**) et celui des Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs était le plus élevé à D90 (approximativement 10^8 CFU/g). Ces deux groupes microbiens n'ont pas été détectés dans les fromages au lait pasteurisé, leur niveau était inférieur au seuil de détection. Le niveau des autres groupes microbiens présents dans les fromages au lait cru (bactéries à Gram négatif, *Pseudomonas* et *Enterobacteriaceae*) n'a pas varié significativement au cours de l'affinage. Dans les fromages au lait pasteurisé, le niveau le plus élevé en *Enterobacteriaceae* a été observé à D2 (approximativement 10^5 CFU/g) et celui de *Pseudomonas* était le plus élevé à D3 (approximativement 10^6 - 10^7 CFU/g ; **Tableau 10**).

1.1.3. Caractéristiques sensorielles des fromages au lait cru et au lait pasteurisé

Pour chaque traitement du lait étudié, les fromages PAT avaient une texture moins ferme, plus souple et plus fondante (**Tableau 11**). La pâte des fromages PAT était plus jaune que celle des fromages MAIS.

Concernant les fromages au lait cru, la croûte des fromages PAT avait une densité et une quantité du boutonneté moins importantes que les fromages MAIS (respectivement, -1,02 et -0,82). Aucun descripteur sensoriel correspondant à l'odeur, au goût et à l'arôme n'a varié significativement selon l'origine de la crème, à l'exception de l'arôme rance qui avait un score plus faible pour les

Tableau 11. Caractéristiques sensorielles des fromages en fin d'affinage (à 150 jours d'affinage)

Parameters (score 0-10)	Cru				Pasteurisé			
	PAT	MAIS	SEM	<i>pvalue</i>	PAT	MAIS	SEM	<i>pvalue</i>
Appearance of cheese rind								
white-grey colour	4.97	4.27	0.262	0.156	4.17	4.80	0.222	0.155
spot colour (white-ochre)	7.54	7.53	0.109	0.976	5.45	5.79	0.215	0.438
spot salience	6.24	7.26	0.191	0.002	3.92	4.25	0.262	0.502
spot quantity	7.12	7.94	0.158	0.006	4.59	5.11	0.271	0.341
Appearance of cheese core								
white-yellow colour	5.66	5.31	0.159	0.017	5.75	5.22	0.173	0.019
core veined	2.04	2.17	0.228	0.692	2.59	3.19	0.309	<i>0.092</i>
core marbled	4.78	4.33	0.230	0.213	5.19	6.09	0.220	0.016
Odour								
intense	5.07	5.28	0.172	0.406	4.81	5.05	0.161	0.279
fresh cream	1.95	1.95	0.166	1.000	2.43	2.17	0.194	0.394
fermented cream	2.59	2.40	0.174	0.469	1.66	1.72	0.163	0.783
butter	1.43	1.59	0.149	0.579	2.20	2.21	0.158	0.965
egg	0.24	0.22	0.096	0.863	0.08	0.03	0.030	0.281
Swiss type cheese	2.20	2.30	0.256	0.802	2.93	3.23	0.177	0.295
yeast	0.78	0.87	0.145	0.711	0.39	0.53	0.098	0.189
vanilla	0.00	0.02	0.012	0.322	0.05	0.06	0.035	0.838
plastic	0.06	0.10	0.036	0.571	0.02	0.20	0.072	0.153
Texture								
firm	5.25	6.59	0.215	<0.001	5.61	6.79	0.193	<0.001
elastic	3.98	3.04	0.232	0.002	4.09	3.12	0.245	<0.001
creamy	4.96	3.84	0.256	0.021	4.95	3.30	0.259	<0.001
adhesive	4.20	3.41	0.251	<i>0.055</i>	4.02	2.83	0.250	0.009
granular	2.17	2.78	0.271	0.164	2.69	3.93	0.287	0.019
Taste								
intense	5.73	6.06	0.157	<i>0.095</i>	5.32	5.69	0.177	<i>0.064</i>
salty	5.54	5.54	0.152	1.000	5.17	5.60	0.170	0.013
sour	3.10	3.04	0.178	0.834	3.05	2.76	0.158	0.273
bitter	2.51	2.49	0.223	0.940	2.91	2.59	0.287	0.199
pungent	2.69	2.66	0.261	0.936	2.17	2.32	0.291	0.617
Aroma								
fresh cream	1.24	1.08	0.149	0.328	1.84	1.64	0.204	0.475
fermented cream	2.54	2.57	0.195	0.894	2.31	2.39	0.179	0.793
butter	1.16	1.06	0.137	0.654	1.47	1.27	0.160	0.307
Swiss type cheese	3.11	2.90	0.178	0.483	3.26	3.69	0.223	0.241
mushroom	0.25	0.23	0.078	0.884	0.14	0.24	0.069	0.361
stable	0.81	0.85	0.160	0.897	0.49	0.57	0.111	0.684
rancid	0.46	1.00	0.162	0.029	0.77	0.70	0.143	0.744
plastic	0.26	0.41	0.112	0.251	0.59	0.44	0.153	0.548
persistent	5.05	5.38	0.185	0.253	4.70	4.80	0.190	0.696

Values reported are the mean from triplicate cheese samples (n=3).

pvalue are in bold when the statistical Student's t-Test when $P < 0.05$, and in italic when $0.05 < P < 0.10$.

fromages PAT que pour les fromages MAIS (respectivement, 0,46 et 1,00 sur 10).

Concernant les fromages au lait pasteurisé, la texture des fromages PAT était aussi plus collante et moins granuleuse que celle des fromages MAIS. Les fromages MAIS avaient aussi une pâte plus marbrée (présence de zones plus claires) que les fromages PAT (respectivement, 6,09 et 5,19 sur 10). Aucun descripteur sensoriel correspondant à l'odeur, au goût et à l'arôme n'a varié significativement selon l'origine de la crème, à l'exception du goût salé qui avait un score plus faible dans les fromages PAT que dans les fromages MAIS (respectivement, 5,17 et 5,60 sur 10).

1.2. Dynamique de la communauté microbienne dans les fromages au cours de l'affinage selon la composition en acides gras de la matière grasse laitière

1.2.1. Diversité alpha dans les fromages au lait cru et au lait pasteurisé selon l'origine de la crème

Le nombre d'OTUs bactériens était supérieur à celui des OTUs fongiques sur la croûte des fromages au lait cru et au lait pasteurisé (**Tableau 12 et Tableau 13**). La richesse des communautés bactériennes, estimée par le Chao1, était plus élevée sur la croûte des fromages au lait cru que sur celle des fromages au lait pasteurisé tout au long de l'affinage.

Sur la croûte des fromages au lait cru, la diversité (indice de Shannon) et l'équitabilité (indice de Simpson) des profils d'OTUs bactériens augmentaient tout au long de l'affinage (**Tableau 12**). Concernant les OTUs fongiques, la diversité et l'équitabilité étaient significativement plus élevées (respectivement, $P=0,011$ et $P=0,006$) sur la croûte des fromages PAT que sur celle des fromages MAIS à D150.

Sur la croûte des fromages au lait pasteurisé, la diversité et l'équitabilité des profils d'OTUs bactériens et fongiques étaient plus élevées à D90 qu'à D150 (**Tableau 13**). La richesse en OTUs fongiques était significativement plus élevée ($P=0,044$) sur la croûte des fromages PAT que sur celle des fromages MAIS à D90.

1.2.2. Effet de la matière grasse laitière sur la communauté fongique de la croûte des fromages au lait cru ou pasteurisé

Pour chaque traitement du lait étudié, le profil des OTUs fongiques les plus abondants était similaire sur la croûte des fromages au lait cru et au lait pasteurisé (**Figure 19A et Figure 19C**). L'abondance relative de *Sporendonema casei* (Fung_1) augmente de façon concomitante à la diminution de l'abondance relative de *Debaryomyces hansenii* (Fung_2 et Fung_4) et de *Penicillium fuscoglaucum* (Fung_3) au cours de l'affinage. A chaque temps d'affinage, l'abondance relative de *D. hansenii* (Fung_2 et Fung_4) était plus élevée sur la croûte des fromages PAT que sur celle des

Tableau 12. Alpha-diversité dans le lait cru et les fromages au lait cru au cours de l'affinage (30, 90 et 150 jours d'affinage) selon l'origine de la matière grasse

Sample	Feed	OTUs		Chao1		Simpson		Shannon	
		16S	ITS2	16S	ITS2	16S	ITS2	16S	ITS2
Milk	PAT	27±9		31.6±10.3		0.55±0.04		1.40±0.13	
	MAIS	30±3		37.9±4.43		0.74±0.21		1.99±0.73	
Rind	PAT	38±7	11±2	39.7±6.47	11.0±1.73	0.16±0.11	0.51±0.07	0.48±0.29	0.97±0.07
D30	MAIS	41±8	11±2	43.0±8.63	12.2±1.61	0.19±0.09	0.57±0.08	0.53±0.23	1.05±0.15
Rind	PAT	51±4	10±2	52.3±1.85	10.2±2.25	0.50±0.02	0.44±0.07	1.33±0.11	0.81±0.13
D90	MAIS	48±8	11±2	50.8±8.55	11.7±2.08	0.46±0.15	0.48±0.13	1.19±0.37	0.91±0.22
Rind	PAT	48±3	12±1	48.8±3.02	13.2±1.04	0.65±0.07	0.49±0.08	1.63±0.27	0.95±0.16
	MAIS	46±4	11±1	46.2±3.66	11.1±1.21	0.55±0.18	0.20±0.06	1.41±0.38	0.44±0.11
	<i>pvalue</i>				<i>0.089</i>		0.006		0.011
Core	PAT	26±3		29.2±6.16		0.05±0.03		0.18±0.09	
D150	MAIS	26±3		28.0±1.09		0.07±0.03		0.22±0.08	

Values reported are the mean from triplicate cheese samples (n=3) ± standard deviation.

The non-significant *pvalue* ($P > 0.10$) by the statistical Student's t-Test was not reported in the table.

pvalue are in bold when the statistical Student's t-Test when $P < 0.05$, and in italic when $0.05 < P < 0.10$.

Tableau 13. Alpha-diversité dans les fromages au lait pasteurisé au cours de l'affinage (30, 90 et 150 jours d'affinage) selon l'origine de la matière grasse

Sample	Feed	OTUs		Chao1		Simpson		Shannon	
		16S	ITS2	16S	ITS2	16S	ITS2	16S	ITS2
Rind	PAT	33±4	10±2	33.6±5.31	11.3±1.15	0.34±0.07	0.49±0.18	0.86±0.19	0.99±0.33
D30	MAIS	30±5	10±1	33.8±5.48	12.5±3.12	0.30±0.08	0.50±0.03	0.75±0.21	0.93±0.02
Rind	PAT	37±2	11±1	41.8±6.93	12.5±1.80	0.46±0.13	0.53±0.14	1.15±0.29	1.00±0.24
D90	MAIS	35±2	9±1	40.0±6.24	9.33±0.58	0.59±0.08	0.53±0.15	1.39±0.25	0.99±0.26
	<i>pvalue</i>		<i>0.067</i>		0.044				
Rind	PAT	31±6	12±2	31.2±4.84	13.7±5.03	0.31±0.17	0.34±0.19	0.81±0.40	0.71±0.37
D150	MAIS	29±3	9±1	31.0±2.00	9.17±1.26	0.20±0.05	0.12±0.04	0.52±0.13	0.31±0.06
Core	PAT	22±6		26.6±8.35		0.14±0.03		0.33±0.05	
D150	MAIS	16±4		18.8±6.60		0.13±0.02		0.32±0.04	

Values reported are the mean from triplicate cheese samples (n=3) ± standard deviation.

The non-significant *pvalue* ($P > 0.10$) by the statistical Student's t-Test was not reported in the table.

pvalue are in bold when the statistical Student's t-Test when $P < 0.05$, and in italic when $0.05 < P < 0.10$.

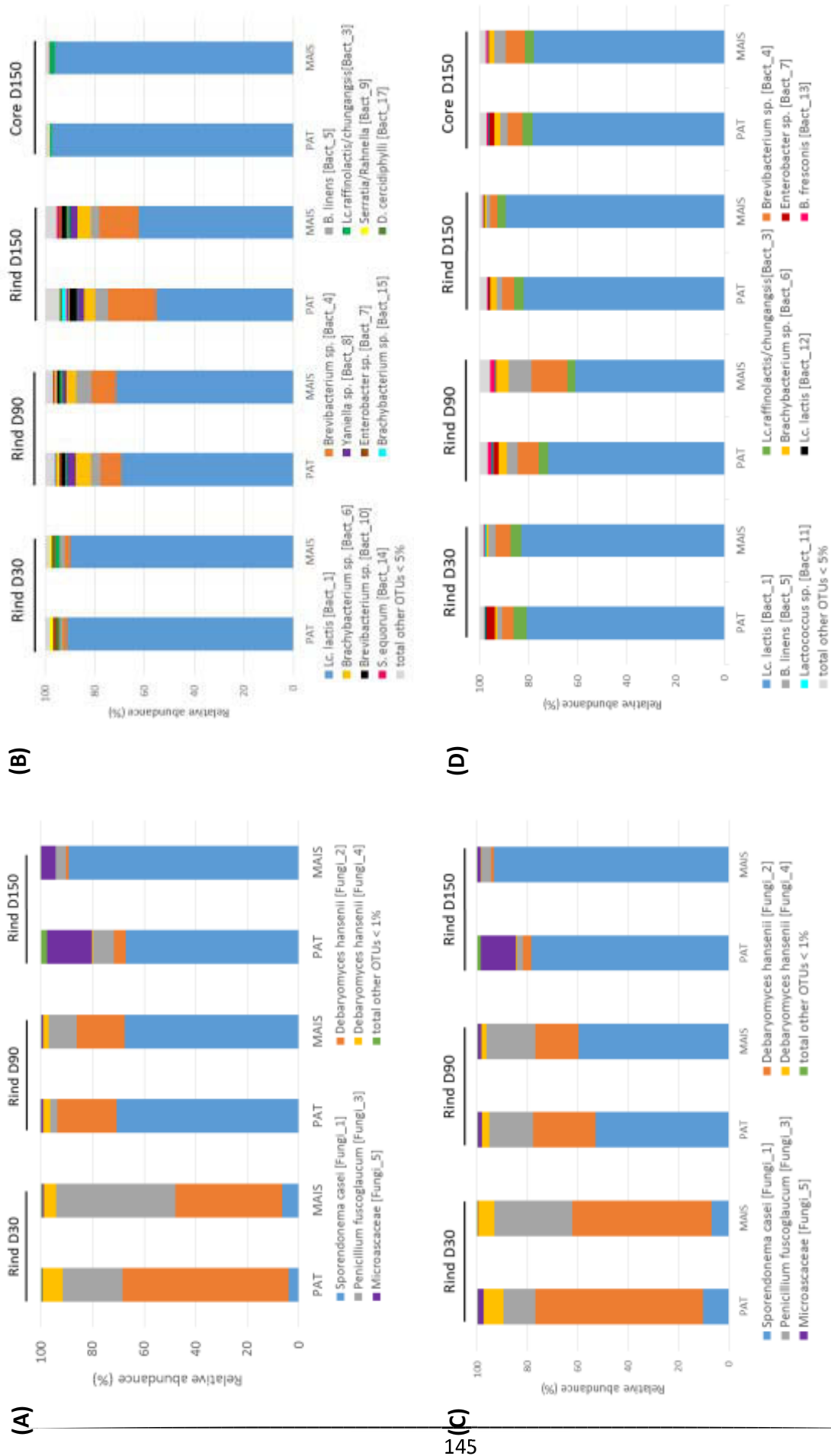


Figure 19. Abondance relative moyenne des OTUs les plus abondants dans les fromages au lait cru **(A-B)** et au lait pasteurisé **(C-D)** avec une crème PAT ou une crème MAIS au cours de l'affinage (30, 90 et 150 jours d'affinage). **A** et **C** : OTUs fongiques; **B** et **D** : OTUs bactériens.

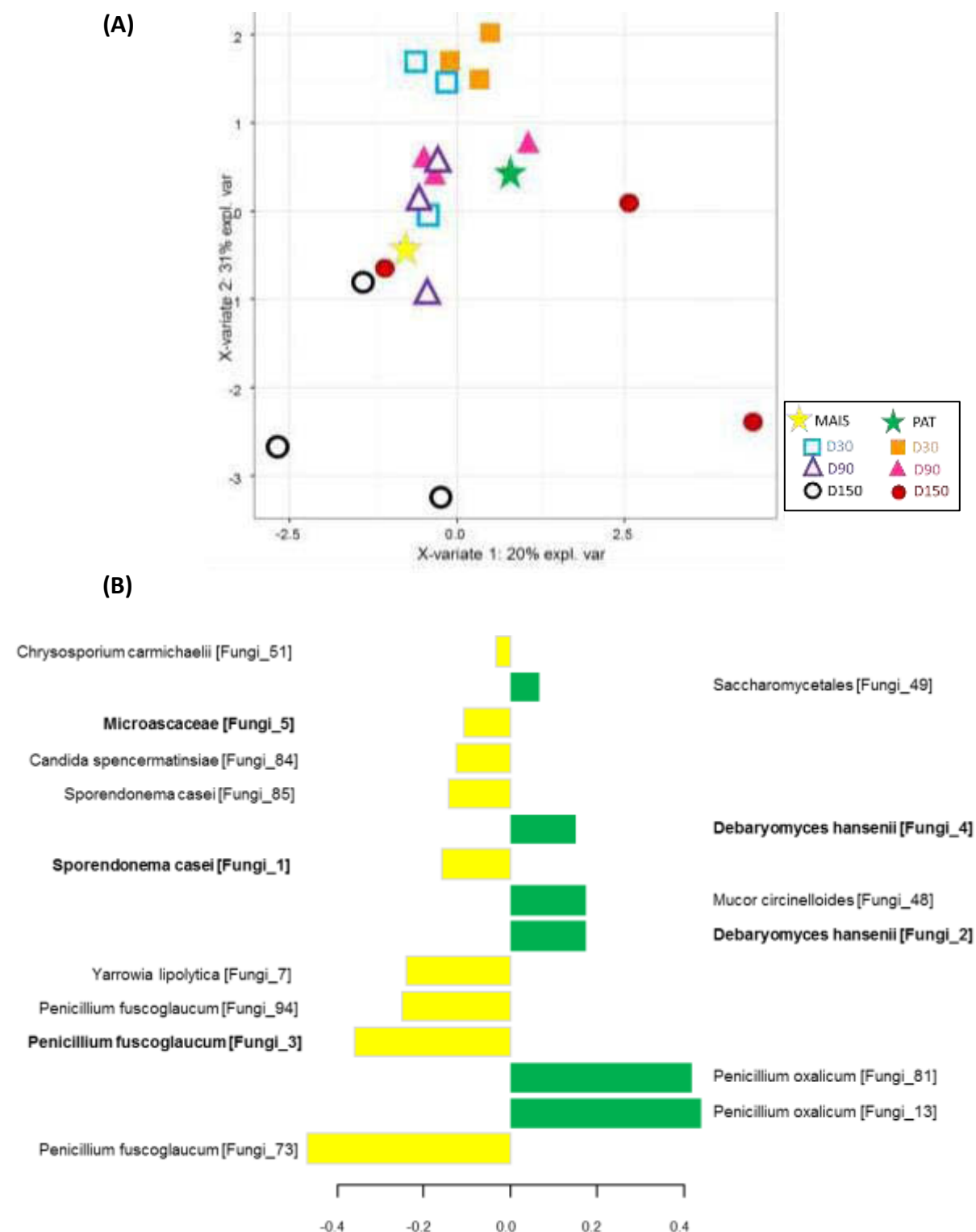


Figure 20. Analyse discriminante PLS réalisée sur l'abondance relative des 15 OTUs fongiques détectés dans 18 échantillons de croûte des fromages au lait cru avec une matière grasse laitière riche en AGI (lot PAT) ou riche en AGS (lot MAIS) au cours de l'affinage (30, 90 et 150 jours d'affinage). **A)** Distribution des échantillons sur les composantes principales (PC) 1 et 2. **B)** Contribution des OTUs fongiques à PC1. Les OTUs fongiques détectés dans au moins deux échantillons et dont l'abondance est supérieure à 0,005% ont été conservés. **En gras**, les 5 OTUs dominants

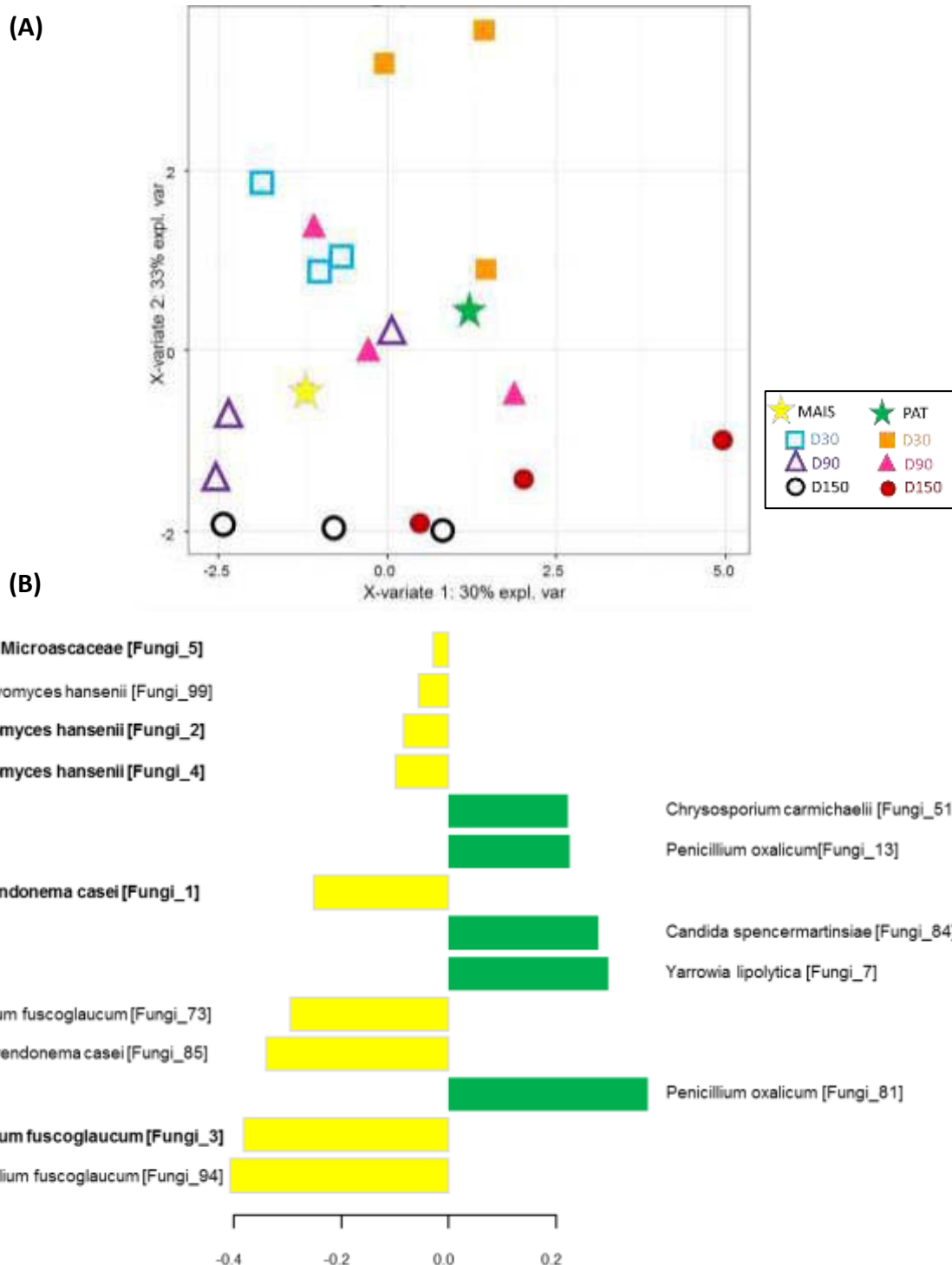


Figure 21. Analyse discriminante PLS réalisée sur l'abondance relative des 14 OTUs fongiques détectés dans 18 échantillons de croûte des fromages au lait pasteurisé avec une matière grasse laitière riche en AGI (lot PAT) ou riche en AGS (lot MAIS) au cours de l'affinage (30, 90 et 150 jours d'affinage). **A)** Distribution des échantillons sur les composantes principales (PC) 1 et 2. **B)** Contribution des OTUs fongiques à PC1. Les OTUs fongiques détectés dans au moins deux échantillons et dont l'abondance est supérieure à 0,005% ont été conservés. **En gras**, les 5 OTUs dominants.

fromages MAIS.

L'analyse discriminante PLS a été réalisée afin d'identifier les OTUs fongiques dont l'abondance relative contribue le plus à discriminer les fromages selon l'origine de la crème quel que soit le temps d'affinage (**Figure 20 et Figure 21**). Quel que soit le traitement du lait, *Penicillium oxalicum* (Fung_13 et Fung_81) a contribué à définir la communauté fongique de la croûte des fromages PAT tandis que *Penicillium fuscoglaucum* (Fung_3, Fung_73 et Fung_94), *Sporendonemas casei* (Fung_1 et Fung_85) et *Microascaceae* (Fung_5) ont contribué à définir la communauté fongique de la croûte des fromages MAIS.

Sur la croûte des fromages au lait cru, au total, 6 OTUs ont contribué à définir la communauté fongique de la croûte des fromages PAT dont les plus discriminants étaient assignés à *P. oxalicum* (Fung_13 et Fung_81) et les plus abondants à *D. hansenii* (Fung_2 et Fung_4) (**Figure 20B**). 9 OTUs ont contribué à définir la communauté fongique de la croûte des fromages MAIS dont les plus discriminants étaient assignés à *P. fuscoglaucum* (Fung_3, Fung_73 et Fung_94) et *Yarrowia lipolytica* (Fung_7) et les plus abondants à *P. fuscoglaucum* (Fung_1) et *Microascaceae* (Fung_5). Comme le montre la **Figure 20A**, la composition de la matière grasse semble avoir eu un effet plus prononcé sur la communauté fongique à D150. Ceci pourrait être principalement lié à *D. hansenii* (Fung_2 et Fung_4) dont l'abondance relative était plus élevée sur la croûte des fromages PAT que sur celle des fromages MAIS à D150 (respectivement, 4,61% et 0,52% sur PAT et 1,09% et 0,16% sur MAIS) ainsi qu'aux OTUs sous-dominants assignés *P. oxalicum* (Fung_13 et Fung_81) dont l'abondance était inférieure au seuil de détection sur la croûte des fromages MAIS, et à l'abondance relative plus faible de *S. casei* (Fung_1) sur la croûte des fromages PAT comparés aux fromages MAIS (67,1% et 89,3%).

Sur la croûte des fromages au lait pasteurisé, au total, 5 OTUs ont contribué à définir la communauté fongique de la croûte des fromages PAT dont le plus discriminant était assigné à *P. oxalicum* (Fung_81) et 9 OTUs ont contribué à définir celle des fromages MAIS dont les plus discriminants étaient *P. fuscoglaucum* (Fung_3, Fung_73 et Fung_94), *S. casei* (Fung_85) et les plus abondants à *S. casei* (Fung_1), *D. hansenii* (Fung_2 et Fung_4) et *Microascaceae* (Fung_5) (**Figure 21B**). Comme le montre la **Figure 21A**, la composition de la matière grasse semble avoir eu un effet plus prononcé sur la communauté fongique à D30. Ceci pourrait être principalement lié à *P. fuscoglaucum* (Fung_3) dont l'abondance relative était plus faible sur la croûte des fromages PAT que sur celle des fromages MAIS à D30 (respectivement, 12,7% et 31,0%). A D150, les différences entre la communauté fongique des fromages PAT et MAIS pourraient être attribuées à l'abondance plus faible de *S. casei* (Fung_1) et *P. fuscoglaucum* (Fung_3) sur la croûte des fromages PAT (respectivement, 78,6% et 2,4% pour les fromages PAT et 93,4% et 3,7% pour les fromages MAIS) alors que l'abondance de *P. oxalicum* (Fung_13 et Fung_51) était inférieure au seuil de détection sur la croûte des fromages MAIS.

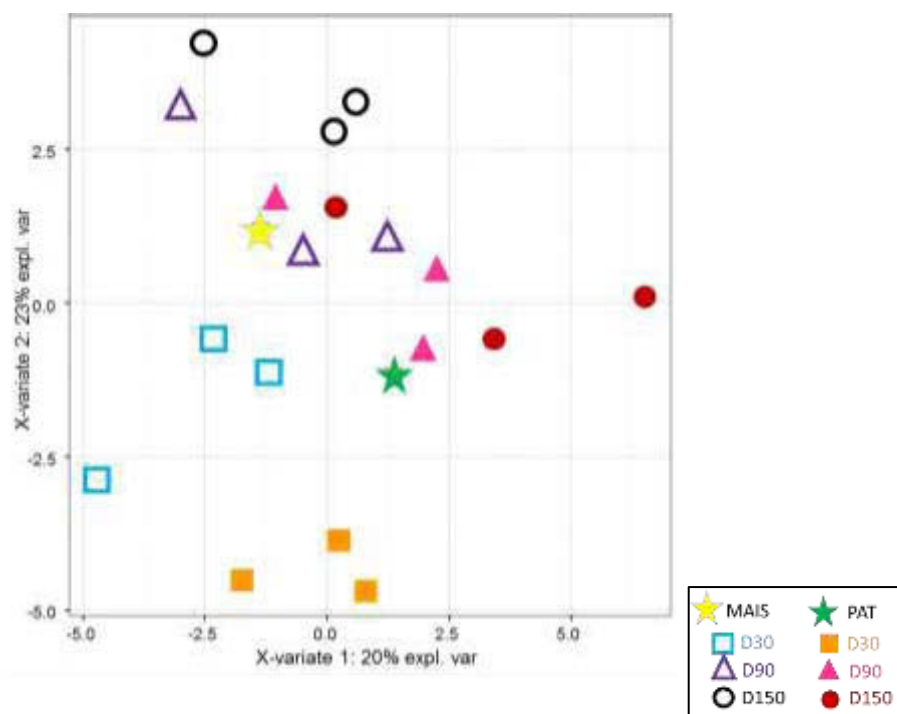
1.2.3. Effet de la matière grasse laitière sur la communauté bactérienne de la croûte des fromages au lait cru ou pasteurisé

Parmi les OTUs bactériens les plus abondants dans les fromages, l'abondance relative de *L. lactis* (Bact_1) était très élevée sur la croûte des fromages à D30 (en moyenne, 90,6% pour les fromages au lait cru et 81,9% pour les fromages au lait pasteurisé ; **Figure 19**). En fin d'affinage, son abondance était plus faible sur la croûte des fromages PAT que sur celle des fromages MAIS quel que soit le traitement du lait (respectivement, 55,2% et 62,6% pour les fromages au lait cru et 82,2% et 89,5% pour les fromages au lait pasteurisé). A chaque temps d'affinage, l'abondance relative de *Lactococcus raffinolactis/chungangensis* (Bact_3) était plus faible sur la croûte des fromages PAT que sur celle des fromages MAIS. Le profil des OTUs bactériens les plus abondants tend à être légèrement différent entre les fromages au lait cru et au lait pasteurisé. Dans les fromages au lait cru, l'abondance relative de *Brevibacterium sp.* (Bact_10) était plus élevée à chaque temps d'affinage sur la croûte des fromages PAT que sur celle des fromages MAIS. Dans les fromages au lait pasteurisé, l'abondance relative de *Enterobacter sp.* (Bact_7) était plus élevée sur la croûte des fromages PAT que sur celle des fromages MAIS.

L'analyse discriminante PLS a aussi été réalisée sur les OTUS bactériens afin d'identifier ceux dont l'abondance relative contribue le plus à discriminer les fromages selon l'origine de la crème quel que soit le temps d'affinage (**Figure 22 et Figure 23**). Quel que soit le traitement du lait, 9 OTUs bactériens sous-dominants (Bact_18, Bact_24, Bact_27, Bact_36, Bact_39, Bact_58, Bact_62, Bact_78, Bact_92) ont contribué à définir la communauté bactérienne de la croûte des fromages PAT tandis que 13 autres OTUs dont plusieurs OTUs dominants (Bact_1, Bact_3, Bact_4, Bact_5, Bact_6, Bact_8, Bact_11, Bact_12, Bact_13, Bact_14, Bact_32, Bact_34, Bact_56) contribuaient à définir la communauté bactérienne de la croûte des fromages MAIS.

Sur la croûte des fromages au lait cru, 31 OTUs au total ont contribué à définir la communauté bactérienne de la croûte des fromages PAT dont les plus discriminants étaient assignés à *Nocardiopsis sp.* (Bact_27), *Ruana albidiflava* (Bact_78), *Acinetobacter lwoffii* (Bact_68) et les plus abondants à *Enterobacter sp.* (Bact_7), *Serratia/Rahnella* (Bact_9), *Brevibacterium sp.* (Bact_10), *Brachybacterium sp.* (Bact_15) et *Dietzia cercidiphylli* (Bact_17) (**Figure 22B**). A l'opposé, 26 OTUs au total ont contribué à définir la communauté bactérienne de la croûte des fromages MAIS dont les plus discriminants étaient assignés à *Lc. raffinolactis/chungangensis* (Bact_3), *Lactococcus sp.* (Bact_11), *L. lactis* (Bact_12), *Bartonella sp.* (Bact_42), *Staphylococcus equorum* (Bact_14), *Moraxella sp.* (Bact_52) et les plus abondants à *L. lactis* (Bact_1), *Brevibacterium sp.* (Bact_4), *B. linens* (Bact_5), *Brachybacterium sp.* (Bact_6) et *Yaniella sp.* (Bact_8). Comme le montre la **Figure 22A**, la composition de la matière grasse semble avoir eu un effet plus prononcé sur la communauté bactérienne à D30. Ceci pourrait être dû à

(A)



(B)

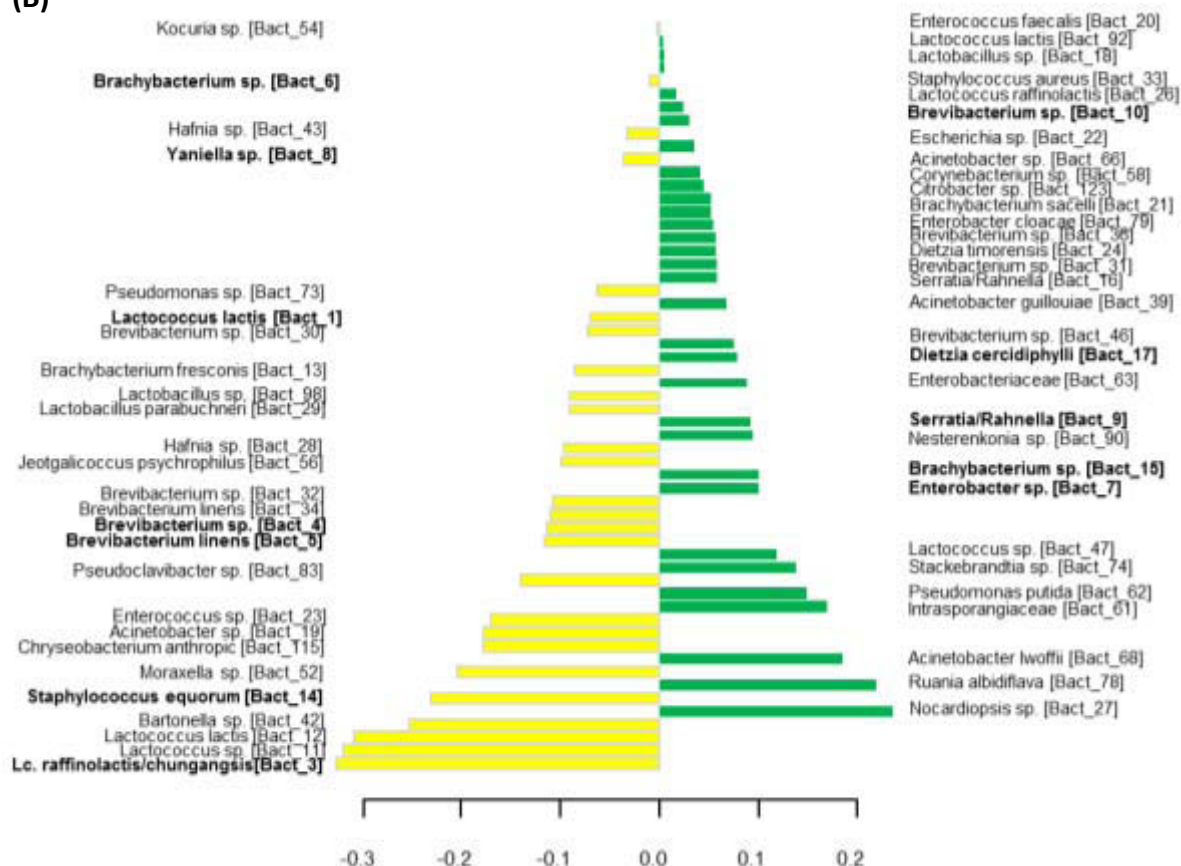
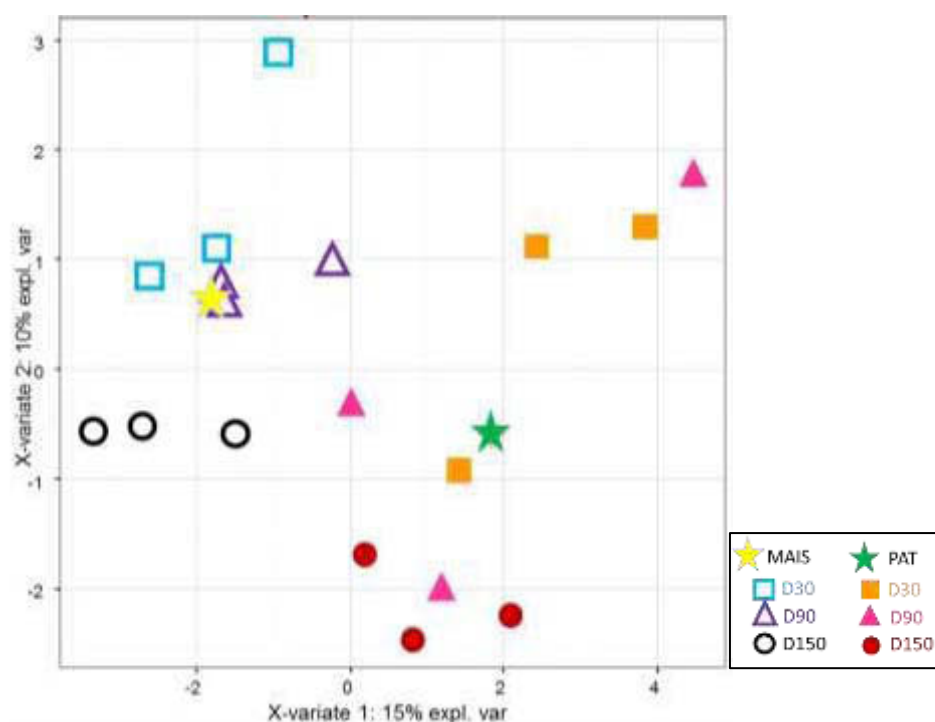


Figure 22. Analyse discriminante PLS réalisée sur l'abondance relative des 57 OTUs bactériens détectés dans 18 échantillons de croûte des fromages au lait cru avec une matière grasse laitière riche en AGI (lot PAT) ou riche en AGS (lot MAIS) au cours de l'affinage (30, 90 et 150 jours d'affinage). **A)** Distribution des échantillons sur les composantes principales (PC) 1 et 2. **B)** Contribution des OTUs bactériens à PC1. Les OTUs bactériens détectés dans au moins deux échantillons et dont l'abondance est supérieure à 0,005% ont été conservés. **En gras**, les 12 OTUs dominants.

(A)



(B)

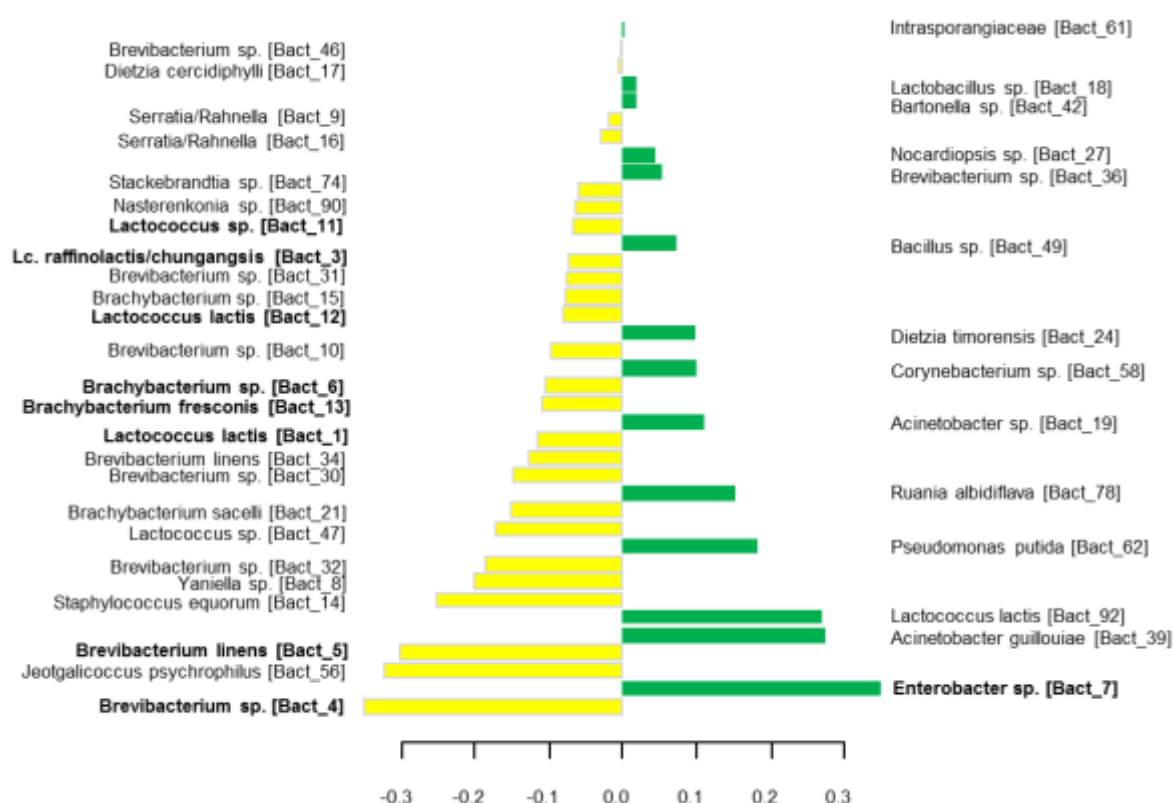


Figure 23. Analyse discriminante PLS réalisée sur l'abondance relative des 39 OTUs bactériens détectés dans 18 échantillons de croûte des fromages au lait pasteurisé avec une matière grasse laitière riche en AGI (lot PAT) ou riche en AGS (lot MAIS) au cours de l'affinage (30, 90 et 150 jours d'affinage). **A)** Distribution des échantillons sur les composantes principales (PC) 1 et 2. **B)** Contribution des OTUs bactériens à PC1. Les OTUs bactériens détectés dans au moins deux échantillons et dont l'abondance est supérieure à 0,005% ont été conservés. **En gras**, les 9 OTUs dominants.

l'abondance relative plus élevée de *Enterobacter sp.* (Bact_7) et *Serratia/Rahnella* (Bact_9) sur la croûte des fromages PAT que sur celle des fromages MAIS (respectivement, 1,8% et 1,3% pour les fromages PAT et 1,2% et 0,9% pour les fromages MAIS) ainsi qu'aux OTUs assignés à *Lc. raffinolactis/chungangensis* (Bact_3), *Brevibacterium sp.* (Bact_4) et *B. linens* (Bact_5) dont l'abondance était plus faible sur les fromages PAT comparés aux fromages MAIS à D30 (respectivement, 0,7%, 1,7% et 1,3% pour les fromages PAT et 1,9%, 2,3% et 1,9% pour les fromages MAIS). A D150, les différences entre la communauté bactérienne des fromages PAT et MAIS pourraient être attribuées à l'abondance plus élevée de *Brevibacterium sp.* (Bact_10) et *Brachybacterium sp.* (Bact_15) sur la croûte des fromages PAT que sur celle des fromages MAIS (respectivement, 3,1% et 1,75% pour les fromages PAT et 2,0% et 0,08% pour les fromages MAIS) ainsi qu'à *L. lactis* (Bact_1), *Brachybacterium sp.* (Bact_6) et *Yaniella sp.* (Bact_8) dont l'abondance relative était plus faible sur les fromages PAT comparés aux fromages MAIS à D150 (respectivement, 55,2%, 4,5% et 2,4% pour les fromages PAT et 62,6%, 5,4% et 3,1% pour les fromages MAIS).

Sur la croûte des fromages au lait pasteurisé, 14 OTUs au total ont contribué à définir la communauté bactérienne de la croûte des fromages PAT dont les principaux étaient *Enterobacter sp.* (Bact_7), *A. guillouiae* (Bact_39) et *L. lactis* (Bact_92) (**Figure 23B**). A l'opposé, 25 OTUs au total contribuaient à définir la communauté bactérienne de la croûte des fromages MAIS dont les principaux étaient *Brevibacterium sp.* (Bact_4), *Jeotgaliococcus psychrophilus* (Bact_56) et *B. linens* (Bact_5). Comme le montre la **Figure 23A**, la composition de la matière grasse semble avoir eu un effet sur la communauté bactérienne aux trois temps d'affinage étudiés.

1.2.4. Effet de la matière grasse laitière sur la communauté bactérienne de la pâte des fromages au lait cru ou pasteurisé à 150 jours d'affinage

Quel que soit le traitement du lait, 3 OTUs bactériens assignés à *Enterobacter sp.* (Bact_7), *Acinetobacter sp.* (Bact_19) et *Acinetobacter guillouiae* (Bact_39) ont contribué à définir la communauté bactérienne de la pâte des fromages PAT tandis que 4 OTUs assignés à *L. lactis* (Bact_1 et Bact_12), *Lc. raffinolactis/chungangensis* (Bact_3) et *Lactococcus sp.* (Bact_11) contribuaient à définir la communauté bactérienne de la pâte des fromages MAIS (**Figure 24 et Figure 25**).

Dans les fromages au lait cru à 150 jours d'affinage, les 24 OTUs bactériens détectés dans la pâte des fromages étaient également retrouvés sur la croûte des fromages (**Figure 24A**). Huit OTUs assignés à *Lc. lactis* (Bact_92), *Enterobacter sp.* (Bact_7), *Serratia/Rahnella* (Bact_16), *Lactobacillus sp.* (Bact_18), *A. guillouiae* (Bact_39), *S. aureus* (Bact_33), *Lc. raffinolactis* (Bact_26) et *Escherichia sp.* (Bact_22) ont contribué à définir à la fois la communauté bactérienne de la pâte et de la croûte des fromages PAT (**Figure 22B et Figure 24B**). A l'opposé, 4 OTUs assignés à *Lc. raffinolactis/chungangensis* (Bact_3), *Lactococcus sp.* (Bact_11), *L. lactis* (Bact_12) et *Hafnia sp.* (Bact_43) contribuaient à définir à

la fois la communauté bactérienne de la pâte et de la croûte des fromages MAIS.

Dans les fromages au lait pasteurisé à 150 jours d'affinage, les 14 OTUs bactériens détectés dans la pâte des fromages étaient également retrouvés sur la croûte des fromages (**Figure 25A**). Quatre OTUs assignés à *Enterobacter sp.* (Bact_7), *Acinetobacter sp.* (Bact_19), *A. guillouiae* (Bact_39) et *Bacillus sp.* (Bact_49) ont contribué à définir à la fois la communauté bactérienne de la pâte et de la croûte des fromages PAT (**Figure 23B et Figure 25B**). A l'opposé, 8 OTUs assignés à *L. lactis* (Bact_1 et Bact_12), *Lc. raffinolactis/chungangensis* (Bact_3), *Brevibacterium sp.* (Bact_4), *B. linens* (Bact_5), *Brachybacterium sp.* (Bact_6), *Lactococcus sp.* (Bact_11) et *S. equorum* (Bact_14) contribuaient à définir à la fois la communauté bactérienne de la pâte et de la croûte des fromages MAIS.

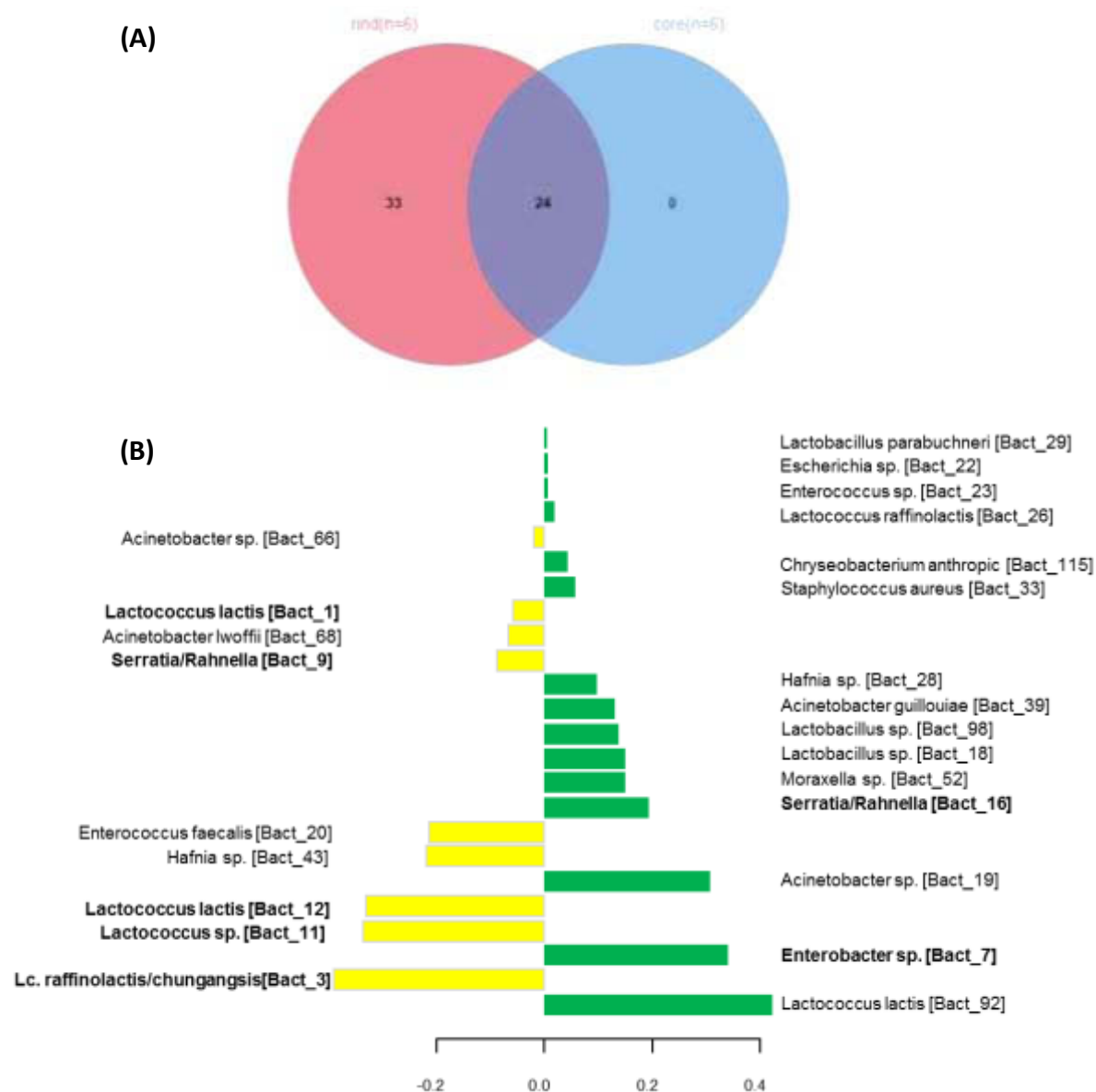


Figure 24. Comparaison de la distribution des OTUs bactériens selon l'origine de la matière grasse laitière entre la croûte et la pâte des fromages au lait cru à 150 jours d'affinage. **A)** Diagramme de Venn **B)** Analyse discriminante PLS réalisée sur l'abondance relative des 24 OTUs bactériens détectés dans 6 échantillons de pâte des fromages au lait cru avec une matière grasse laitière riche en AGI (lot PAT) en vert ou riche en AGS (lot MAIS) en jaune. La première et la deuxième composante principale représentent 23% de la variance totale. Seule la contribution des OTUs bactériens à PC1 est représentée. Les OTUs bactériens détectés dans au moins deux échantillons et dont l'abondance est supérieure à 0,005% ont été conservés. **En gras**, les 7 OTUs dominants.

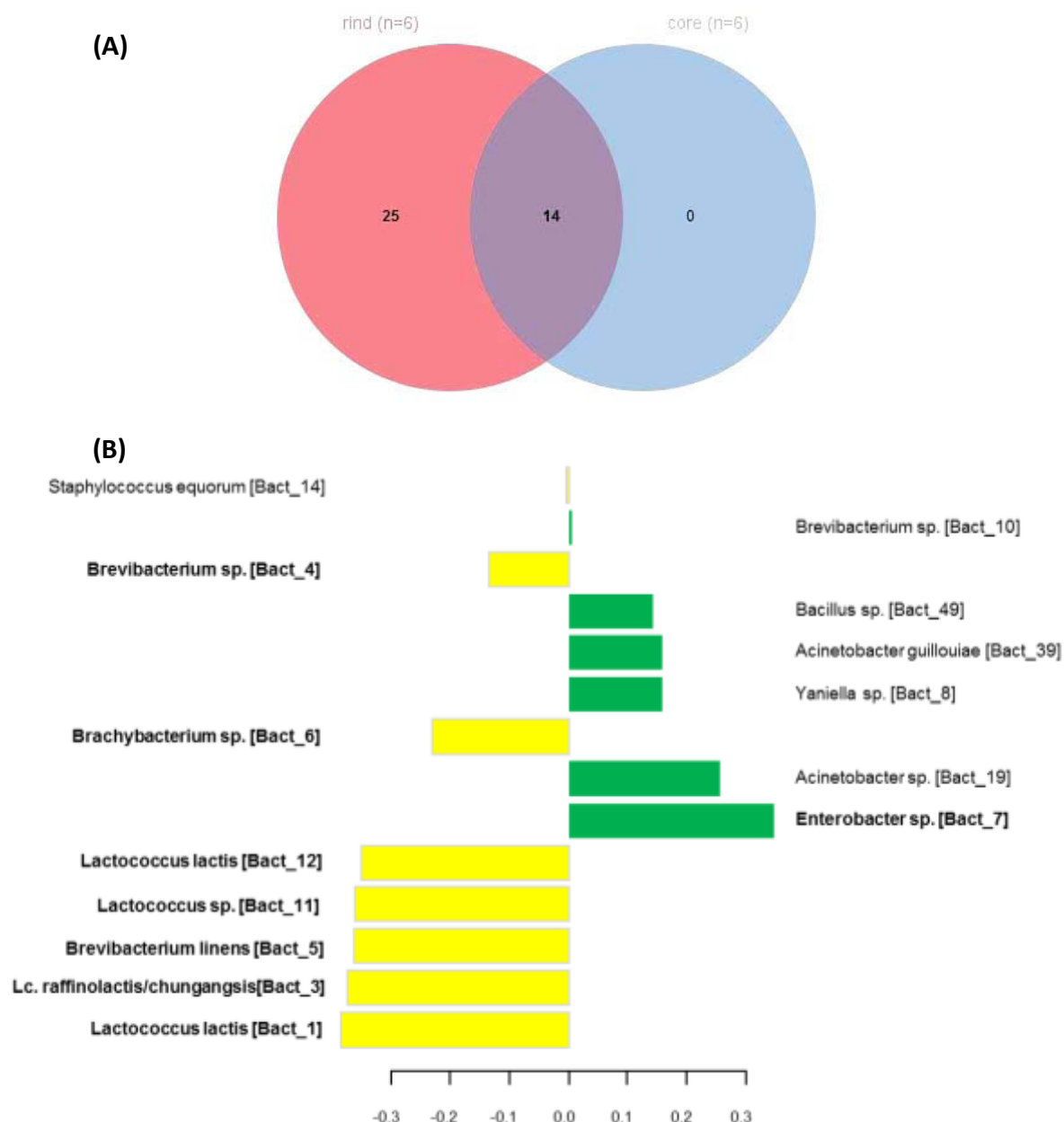


Figure 25. Comparaison de la distribution des OTUs bactériens selon l'origine de la matière grasse laitière entre la croûte et la pâte des fromages au lait pasteurisé à 150 jours d'affinage. **A)** Diagramme de Venn **B)** Analyse discriminante PLS réalisée sur l'abondance relative des 14 OTUs bactériens détectés dans 6 échantillons de pâte des fromages au lait pasteurisé avec une matière grasse laitière riche en AGI (lot PAT) ou riche en AGS (lot MAIS). La première et la deuxième composante principale représentent 69% de la variance totale. Seule la contribution des OTUs bactériens à PC1 est représentée. Les OTUs bactériens détectés dans au moins deux échantillons et dont l'abondance est supérieure à 0,005% ont été conservés. **En gras**, les 8 OTUs dominants.

2. Discussion

2.1. Effet de la composition de la matière grasse laitière sur les caractéristiques sensorielles des fromages

Le principe de notre deuxième dispositif était de fabriquer des fromages de type Cantal à partir du même lait écrémé de composition microbiologique et biochimique identique et de deux crèmes pasteurisées avec une composition en acides gras différente.

L'effet du régime alimentaire sur le profil en acides gras de la matière grasse laitière est cohérent avec la littérature (Chilliard et al., 2001; Couvreur et al., 2006; Ferlay et al., 2006). Globalement, la teneur en AGI était plus élevée de l'ordre de 8 à 9 g/100 g d'acides gras totaux dans les laits des vaches conduites au pâturage (qu'ils soient crus ou pasteurisés) comparativement aux laits des vaches nourries avec une ration à base d'ensilage de maïs. Ce différentiel est du même ordre de grandeur que celui rapporté par Ferlay et al. (2006). Plus précisément, le régime alimentaire à base d'herbe a favorisé la diminution de la concentration en C16:0 et en AGS à chaîne courte dans les laits et l'augmentation de la concentration en AGS à longue chaîne, en C18:0, en C18:1*trans*11, en C18:1*cis*9, en C18:3*n*-3, en CLA, en AGMI et AGPI. Cet effet du pâturage est principalement lié à la teneur élevée de l'herbe en lipides riches en C18:3*n*-3 qui, lors de sa biohydrogénation partielle dans le rumen, est à l'origine d'acides gras intermédiaires qui inhibent la synthèse *de novo* des acides gras à chaîne courte et d'une partie du C16:0 (Ferlay et al., 2006). Dans cet essai, la teneur du lait des vaches conduites au pâturage en C18:3*n*-3 est restée modérée (<0,8 g /100 g d'acides gras totaux) comparativement aux valeurs rapportées dans d'autres essais (Coppa et al., 2015; Ferlay et al., 2006) vraisemblablement en raison de la complémentation du pâturage avec des céréales (4 kg/jour) distribués à la moitié des vaches conduites au pâturage (Coppa et al., 2015). Le profil en acides gras des fromages reflète parfaitement celui des laits natifs comme montré précédemment par Lucas et al. (2006b). Le profil en acides gras des fromages au lait cru et au lait pasteurisé est resté comparable à celui des laits d'origine selon l'alimentation des animaux (pâturage *versus* ensilage de maïs).

Dans notre expérimentation, nous avons vérifié que les laits PAT, crus ou pasteurisés, ne se différenciaient pas des laits MAIS au niveau biochimique et concernant le niveau des principaux groupes microbiens. Concernant les fromages affinés, l'origine de la crème n'a pas eu d'effet sur la composition biochimique globale des fromages, leur niveau de protéolyse et le niveau des principaux groupes microbiens comme montré précédemment par Buchin et al. (1998) dans une étude dans laquelle la crème des laits issus d'une ration à base de foin ou de pâturage a été mélangée au même lait écrémé pour fabriquer des fromages à pâte pressée non cuite.

Les différences notables de texture observées selon l'origine de la crème confirment le rôle majeur de la composition de la matière grasse laitière sur la texture des fromages (Agabriel et al., 2004; Bugaud et al., 2001c; Coppa et al., 2011a; Martin et al., 2005). Dans notre étude, la texture des fromages PAT était moins ferme, plus souple et plus fondante que celle des fromages MAIS ce qui est en accord avec leur teneur plus élevée en AGI dont la température de fusion est basse et leur teneur plus faible en AGS dont la température de fusion est élevée (C16:0 notamment) comme en témoigne le rapport C18:1*cis*9/C16:0 plus élevé dans les fromages PAT. Les différences de texture observées selon l'origine de la crème peuvent être attribuées uniquement à la composition de la matière grasse dans la mesure où la teneur des fromages en matière sèche et en matière grasse, la minéralisation de la pâte et la protéolyse des fromages qui ont également un rôle important sur la texture des fromages (Fox et al., 2004) n'ont pas varié selon l'origine de la matière grasse.

La couleur de la pâte des fromages PAT au lait cru et au lait pasteurisé était plus jaune que celle des fromages MAIS comme observé par Martin et al. (2005) et Nozière et al. (2006). La coloration plus jaune des fromages issus de vaches conduites au pâturage est généralement attribuée à leur teneur plus élevée en pigments caroténoïdes liposolubles. Ces pigments proviennent directement des aliments consommés par les vaches et l'herbe fraîche est nettement plus riche en β -carotène que l'ensilage de maïs (Nozière et al., 2006). De façon surprenante, cette différence classiquement observée lors de l'analyse sensorielle des fromages n'a pas été confirmée par spectrométrie. De plus, nous avons constaté que la couleur des laits crus PAT mesurée par spectrométrie était légèrement moins jaune que celle des laits crus MAIS. Nous pouvons supposer que la pasteurisation des crèmes PAT et MAIS a nivelé les différences de couleur mesurées par spectrométrie en induisant une légère oxydation de la crème ou, comme suggéré par Frétin et al. (2016 *In Press*), un brunissement dû à une réaction de Maillard (Van Boekel, 1998) au cours du chauffage de la crème. L'absence d'effet de l'origine de la crème sur la coloration jaune de la pâte lorsqu'elle est mesurée instrumentalement pourrait également suggérer que la coloration plus jaune-orangé des produits laitiers issus du pâturage n'est pas liée uniquement à des pigments liposolubles comme les caroténoïdes mais que d'autres pigments hydrosolubles comme la riboflavine pourraient également y contribuer. Les premiers travaux sur les facteurs de variation de cette vitamine dans le lait montrent en effet que les laits issus du pâturage en sont plus pourvus que les laits issus de rations à base d'ensilage de maïs (Vallet et al., 2013).

Sur le plan des odeurs, des arômes et des saveurs, la plupart des auteurs ayant comparé des beurres ou des fromages fabriqués avec des laits produits par des animaux nourris avec des rations à base d'ensilage de maïs ou d'herbe, qu'elle soit pâturée ou conservée sous forme de foin ou d'ensilage concluent à l'existence de différences significatives (Martin et al., 2005). Les produits laitiers issus des

régimes à base d'ensilage de maïs se caractérisent généralement par une flaveur moins intense et moins diversifiée. Contrairement aux hypothèses émises par certains auteurs (Coppa et al., 2011b) pour expliquer les différences de flaveur observées selon la nature de l'alimentation des vaches, nos résultats montrent clairement que la composition de la matière grasse n'est pas en cause. En effet, les fromages fabriqués dans notre étude à partir des deux crèmes de composition pourtant très différente n'étaient pas clairement différenciés selon leur odeur et leur arôme. Cette absence d'effet n'est pas surprenante au regard du faible nombre de composés volatils des fromages qui ont varié significativement selon l'origine de la crème (24 dont deux AGV sur les 132 identifiés). De plus, parmi ces 24 composés, seul l'acide isobutyrique (légèrement plus élevé dans les fromages MAIS au lait pasteurisé) fait partie des principaux composés d'odeur actifs du Cantal identifiés par Cornu et al. (2009) (acide butyrique, 2,3-butanedione, 3-méthylthio-propanal, hexanal, acide acétique, acide isobutyrique et 1-octen-3-ol). Parmi les composés volatils qui permettaient de différencier les fromages selon l'origine de la matière grasse 7 étaient communs entre les fromages au lait cru et au lait pasteurisé : pentanal, 1-pentanol, 3-méthyl-2-pentanol, 2-éthyl-hexyl acétate, 2-éthyl-furane, méthyl-benzène et 8-nonen-2-one. Les aldéhydes étaient globalement plus abondants dans les fromages PAT que dans les fromages MAIS ; cependant, les aldéhydes sont des composés transitoires car ils sont rapidement transformés en alcool ou en leur acide correspondant par les activités microbiennes (Dunn and Lindsay, 1985; McSweeney and Sousa, 2000). D'autre part, les cétones étaient globalement moins abondants dans les fromages PAT que dans les fromages MAIS ; mais leur seuil de perception est faible (Bovolenta et al., 2014; Molimard and Spinnler, 1996). Les aldéhydes, les cétones et les alcools primaires et secondaires sont issus du catabolisme des acides gras (Collins et al., 2003) ce qui explique que la composition de la matière grasse a un effet prépondérant sur ces composés. De plus, les activités microbiennes jouent un rôle essentiel dans les voies métaboliques impliquées dans la formation des différents composés volatils (Marilley and Casey, 2004) mais aucun des groupes microbiens dans les fromages n'a été affecté par la composition de la matière grasse laitière. Ceci pourrait expliquer que les fromages fabriqués dans notre étude à partir des deux crèmes n'étaient pas clairement différenciés selon leur odeur, leur goût et leur arôme.

Seulement pour les fromages au lait cru, nous avons observé que la densité du boutonné et son relief étaient plus faibles sur la croûte des fromages PAT que sur celle des fromages MAIS. Cet effet de la composition de la matière grasse sur le développement de la croûte des fromages au lait cru pourrait être dû au microbiote de la croûte des fromages, et plus particulièrement aux interactions entre les microorganismes endogènes du lait cru et les ferments puisque cette différence d'aspect de la croûte n'a pas été constatée sur les fromages au lait pasteurisé. Le niveau des principaux groupes microbiens n'était pas modifié selon l'origine de la crème mais nous pouvons supposer que les

équilibres microbiens sur la croûte des fromages au lait cru peuvent être différents selon la composition en acides gras de la matière grasse laitière comme l'ont déjà suggéré Coppa et al. (2011a) et Lerch et al. (2015) respectivement sur des fromages de type Cantal et Saint-Nectaire. Sur des fromages de type Cantal, Coppa et al. (2011a) ont attribué le plus faible développement de la croûte qu'ils ont observé avec les laits les plus riches en AGI à une possible exsudation à la surface du fromage de la matière grasse plus fluide. Cette exsudation aurait modifié l'environnement physico-chimique de la croûte dans un sens défavorable au développement de la moisissure (*Sporendonema casei*) qui, en se développant en colonies est responsable de la formation du « boutoné » à la surface des fromages de type Cantal (Pitt and Hocking, 2009; Ratomahenina et al., 1994). Pour la première fois, à notre connaissance, nous avons déterminé séparément le niveau de lipolyse dans la pâte et la croûte des fromages de type Cantal. Le niveau de lipolyse dans la pâte des fromages de type Cantal était en accord avec le niveau observé pour les fromages à pâte pressée non cuite, elle est peu intense (< 2%) (Collins et al., 2003). De façon surprenante, le niveau de lipolyse observé sur la croûte des fromages de notre étude était équivalent à celui des fromages à pâte persillée (> 20%). Nous pouvons supposer que les acides gras libérés dans la croûte des fromages au cours de la lipolyse pourraient avoir un effet antimicrobien sur le microbiote de surface des fromages. En effet, les propriétés antimicrobiennes des acides gras libres insaturés à longue chaîne et des acides gras libres saturés à chaîne moyenne ont été démontrées *in vitro* depuis plusieurs années (Kabara et al., 1972; Nieman, 1954). Ces études ont montré que le pouvoir inhibiteur des acides gras était variable selon leur nature (saturé ou insaturé, longueur de la chaîne de carbone, nombre de doubles liaisons, configuration *cis* ou *trans*). Nous faisons l'hypothèse que les acides gras libres insaturés à longue chaîne, CLA et C18:3n-3, avec respectivement des teneurs 3 et 2,6 fois plus élevées sur la croûte des fromages PAT comparés aux fromages MAIS auraient potentiellement un effet inhibiteur sur la croissance des microorganismes responsables de l'aspect de la croûte des fromages de type Cantal.

2.2. Effet de la composition de la matière grasse sur les équilibres microbiens à la surface des fromages

La croûte des fromages à pâte pressée non cuite a été très peu étudiée jusqu'à présent contrairement à celle des fromages à pâte molle (croûte fleurie et lavée), et quel que soit le modèle fromager, il s'agit de la première étude sur les équilibres bactériens et fongiques de la croûte des fromages au lait cru et au lait pasteurisé au cours de l'affinage.

Le nombre d'OTUs bactériens avec une abondance supérieure à 1% (en moyenne, 10,5 OTUs) était plus élevé que celui des OTUs fongiques (en moyenne, 5 OTUs) sur la croûte des fromages en accord avec (Wolfe et al., 2014). La richesse des communautés bactériennes était maximale à 90 jours

d'affinage sur la croûte des fromages au lait cru et sur celle des fromages au lait pasteurisé. Cependant, la diversité bactérienne (indices de Shannon et Simpson) tendait à augmenter sur la croûte des fromages au lait cru jusqu'en fin d'affinage, ce qui traduit l'augmentation de l'abondance relative des OTUs sous-dominants au cours de l'affinage. En effet, le calcul de ces indices de diversité prend non seulement en compte le nombre d'OTUs mais également leur distribution au sein de l'échantillon considéré : l'indice de Shannon est plus sensible aux variations de l'abondance des OTUs rares et l'indice de Simpson est plus sensible à celles des OTUs les plus abondants (Peet, 1974).

Dans notre étude, la diversité fongique des fromages au lait cru avec une crème riche en AGI était plus élevée que celle des fromages avec une crème riche en AGS en fin d'affinage contrairement aux quelques études réalisées dans des produits laitiers qui n'ont montré aucun effet des acides gras et de leurs dérivés sur la croissance de microorganismes particuliers (Boyaval et al., 1995; Hauerlandová et al., 2014) ou sur le niveau des principaux groupes microbiens (Buchin et al., 1998). Quel que soit le traitement du lait, les fromages PAT avec une crème riche en AGI étaient caractérisés par une abondance relative plus élevée d'espèces fongiques et bactériennes sous-dominantes qui n'avaient pas été volontairementensemencées comme ferments. En revanche, les fromages MAIS avec une crème riche en AGS étaient caractérisés par une abondance relative plus élevée de certaines espèces fongiquesensemencées comme ferments, comme *P. fuscoglaucum* et *S. casei*, associées à d'autres espèces bactériennes et fongiques. La croûte de ces fromages riches en AGS semble être un environnement plus favorable pour les bactéries dominantes telles que *L. lactis*,ensemencée comme ferment, ou d'autres lactocoques, qui étaient aussi plus abondantes dans la pâte des fromages MAIS.

Les différences d'équilibre microbien observées entre les fromages PAT et MAIS pourraient contribuer à expliquer les différences d'aspect de la croûte des fromages au lait cru. L'abondance relative de *S. casei*, ferment d'affinage considéré comme le principal responsable de la formation du boutoné sur les fromages de type Cantal (Coppa et al., 2011a; Ratomahenina et al., 1994), était plus élevée (1,3 fois et 1,2 fois respectivement pour les fromages au lait cru et au lait pasteurisé) sur la croûte des fromages MAIS où le boutoné était le plus développé, que sur celle des fromages PAT. Le microbiote autochtone du lait cru peut interagir positivement ou négativement avec le développement des ferments d'affinage impliqués dans le développement du boutoné sur la croûte des fromages. Nous pouvons supposer que ces ferments sélectionnés pour leur capacité à former un boutoné ont été isolés sur des fromages plutôt riches en AGS.

Discussion générale et perspectives

Plusieurs études ont montré un effet de l'alimentation des vaches laitières sur les caractéristiques sensorielles des fromages (Coppa et al., 2011a; Coulon et al., 2004; Lucas et al., 2006; Martin et al., 2005). Les différents régimes alimentaires modifient la composition biochimique du lait, notamment la composition de la matière grasse laitière. Ces observations ont généralement été faites sur des fromages au lait cru. Les effets des régimes alimentaires sur les caractéristiques sensorielles des fromages sont réduits lorsque le lait est pasteurisé (Verdier-Metz et al., 2002) ce qui suggère que le microbiote du lait et/ou d'autres composants thermosensibles du lait sont variables selon l'alimentation des vaches et jouent un rôle essentiel pour expliquer son effet sur le développement des caractéristiques sensorielles des fromages (Zhang et al., 2015 ; Mariley et Casey, 2004). Au cours de ces travaux de thèse, mon objectif était de comprendre les rôles respectifs et les interactions de la composante biochimique et de la composante microbiologique du lait, modulées par l'alimentation des vaches, dans la construction des caractéristiques sensorielles des fromages. De façon générale, dans le dispositif 1, chacun des deux systèmes de production du lait au pâturage (extensif *versus* semi-intensif) était associé à une composition biochimique et microbiologique propre des laits. Pour comprendre l'effet des systèmes sur la composante microbiologique des laits et des fromages, nous avons étudié la structure des communautés bactériennes des trayons des vaches jusqu'aux fromages affinés au lait cru. Dans le dispositif 2, la communauté microbienne du lait (cru ou pasteurisé) était identique, seule la composition de la matière grasse laitière a varié. La discussion va porter premièrement sur l'assemblage de la communauté bactérienne des trayons jusqu'aux fromages au sein des deux systèmes de pâturage, et deuxièmement sur la construction des caractéristiques sensorielles des fromages (texture, flaveur, aspect de la croûte) en lien avec les composantes biochimique et microbiologique du lait.

1. Assemblage de la communauté bactérienne des trayons des vaches jusqu'aux fromages affinés

Pour la première fois, l'assemblage de la communauté bactérienne des trayons des vaches jusqu'aux fromages affinés a été caractérisé en utilisant l'approche « metabarcoding » basée sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S. Le traxon étant considéré comme l'une des principales sources d'ensemencement du lait (Michel et al., 2006; Vacheyrou et al., 2011), nous avons fait le choix de nous focaliser sur ce réservoir microbien. Nous avons constaté que 85% des OTUs bactériens détectés dans les laits et 27% des OTUs bactériens détectés dans les fromages étaient communs aux OTUs présents sur la peau des trayons. Nous confirmons que le traxon est un potentiel réservoir de diversité microbienne non seulement pour le microbiote des laits mais aussi pour celui des fromages. Les

biofilms formés sur les surfaces des équipements de traite, de stockage, de transport et des installations fromagères sont aussi de potentiels réservoirs microbiens (Marchand et al., 2012). Au sein des biofilms, les bactéries sont protégées grâce à la coopération multi-espèces et à la sécrétion d'une matrice extracellulaire. Lors du contact du lait avec les différentes surfaces sur lesquelles les biofilms adhèrent, des bactéries peuvent se détacher des biofilms alors que d'autres peuvent venir alimenter ces biofilms : le lait pourrait être un réservoir transitoire de microorganismes. Plusieurs groupes et espèces microbiennes présents dans les différents compartiments de l'étable (Vacheyrou et al., 2011) ou sur la surface des équipements de fromagerie (Bokulich and Mills, 2013a) ont été retrouvés dans les laits et les fromages. Cependant, le concept de transfert microbien entre ces différents biotopes (trayon, lait, fromage) doit être abordé avec prudence. Grâce à leur temps de génération court et à la plasticité de leur génome, les microorganismes sont capables de s'adapter rapidement à différents environnements. En comparant les génomes de souches isolées des fromages à ceux des souches issues de l'environnement, Ayad et al. (1999) et Almeida et al. (2014) ont constaté que les souches fromagères de *Lc. lactis* ou *Arthrobacter sp.* avaient acquis des gènes par mutation ou par transfert de gènes qui ont favorisé leur adaptation dans les fromages. Ainsi, les microorganismes sous-dominants sur la peau des trayons ou bien dans le lait pourraient avoir l'opportunité de se développer dans un environnement plus favorable comme le fromage. Ceci nous conduit à nous interroger sur la probabilité de rencontrer des souches identiques sur le plan génétique dans les différents biotopes et à suggérer que les éventuels transferts microbiens doivent être étudiés au niveau du génome en comparant des génomes entiers. L'étude de ces transferts est encore difficile puisqu'elle dépend du séquençage du génome de souches isolées, même si les techniques actuelles de métagénomique permettent d'accéder à la séquence du génome des souches dominantes de chaque biotope.

Dans le cadre du dispositif 1, nous avons découvert que les systèmes de pâturage avaient principalement modifié la structure de la communauté bactérienne des trayons, et dans une moindre mesure, celle des laits crus et des fromages au lait cru. Des études antérieures ont montré que l'alimentation, le logement des animaux (intérieur *versus* extérieur), les matières fécales ou encore les pratiques d'hygiène de traite avaient une influence sur le microbiote des trayons (Monsallier et al., 2012; Verdier-Metz et al., 2012a, 2015; Zdanowicz et al., 2004). Les différences observées sur le microbiote de la peau des trayons dans ce dispositif expérimental sont perceptibles malgré le fait que les deux groupes d'animaux ne soient pas totalement dissociés puisqu'ils étaient traités avec la même machine à traire. Même s'ils pâturaient des parcelles distinctes conduites de façon différenciée (fertilisation minérale ou non, quantité de fertilisants organiques, chargement instantané, stade de maturité de l'herbe, composition botanique), ces parcelles étaient imbriquées les unes dans les autres et recevaient un fertilisant organique (fumier et lisier) qui était identique dans les deux systèmes de

pâturage. A notre connaissance, l'impact des systèmes de production du lait au pâturage sur la composition microbienne de la phyllosphère et de la surface du sol qui correspondent aux zones de couchage des vaches n'a jamais été exploré. Ces connaissances pourront être approfondies car des échantillons environnementaux d'herbe, de matières fécales et de la surface des zones de couchage ont été prélevés dans la période des fabrications fromagères du dispositif 1. Les trayons des vaches par contact avec ces différents réservoirs de microorganismes pourraient être un médiateur de l'effet des systèmes de production du lait. La citerne de la mamelle est un autre réservoir encore peu étudié dont le microbiote est propre à chaque animal (Falentin et al., 2016). L'originalité de ce dispositif était que les autres sources connues d'ensemencement du lait, de la salle de traite jusqu'aux cuves de la fromagerie, étaient identiques ce qui a probablement participé à atténuer l'effet des systèmes de pâturage sur le microbiote du lait. L'ajout de ferments d'acidification et d'affinage identiques et à des doses largement supérieures aux niveaux des groupes microbiens autochtones des laits a vraisemblablement contribué à masquer l'effet des systèmes de pâturage sur la communauté bactérienne des fromages. Les OTUs dont l'abondance relative différait en fonction du système n'étaient pas forcément les mêmes dans les fromages et sur les trayons. La composition biochimique du lait, et plus particulièrement, celle en acides gras de la matière grasse laitière pourrait avoir modifié la dynamique des populations microbiennes au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages ce qui pourrait expliquer cette différence.

Dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur une unique source de microorganismes des laits et des fromages. Il serait intéressant d'étendre cette étude aux multiples réservoirs connus de microorganismes, de la surface des sols et de la phyllosphère jusqu'à l'ambiance de la cave d'affinage. Cette étude pourrait, dans un premier temps, être réalisée en utilisant l'approche « metabarcoding » afin d'identifier les principaux réservoirs environnementaux d'espèces microbiennes d'intérêt technologique. Ceci permettrait dans un second temps de comparer les caractéristiques génétiques des souches issues de ces réservoirs à celles des laits et des fromages, par des approches de génomique ou de métagénomique.

2. Construction des caractéristiques sensorielles des fromages en lien avec les composantes biochimique et microbiologique du lait

2.1. Flaveur

Les différences sensorielles les plus importantes selon l'alimentation des animaux sont généralement rapportées dans des études de terrain qui consistent à comparer des fromages fabriqués à différentes périodes par des producteurs fermiers (Agabriel et al., 2004; Bugaud et al., 2001b; Martin et al., 2005). Ces études s'efforcent de minimiser les biais potentiels liés au fait que les fabrications ne soient pas réalisées le même jour mais tous les facteurs ne sont pas contrôlés comme l'état de propreté des animaux, leur stade de lactation, les conditions de traite, l'ambiance des fromageries et des caves (température et hygrométrie) et les ferments qui sont susceptibles d'évoluer dans le temps. Dans les études réalisées en conditions contrôlées comme la nôtre dans laquelle les fabrications fromagères sont réalisées dans la même fromagerie expérimentale à partir du lait des vaches traites avec la même machine à traire et où les fromages sont affinés dans les mêmes conditions, les effets de l'alimentation des animaux sont généralement atténués, notamment sur la flaveur des fromages qu'ils soient au lait cru ou au lait pasteurisé. Dans un dispositif très similaire au nôtre, Coppa et al. (2011b) avait aussi observé un faible effet du système de pâturage sur la flaveur des fromages. Le développement de la flaveur des fromages est aussi généralement attribué à la diversité et aux activités microbiennes (Fox et al., 2000; Grappin and Beuvier, 1997) qui contribuent aux principales modifications de la composition biochimique du fromage au cours de l'affinage. En raison du format des fromages de type Cantal fabriqués dans cette étude (10 kg), les microorganismes présents dans la pâte vont largement être impliqués dans le développement de la flaveur des fromages par rapport à d'autres modèles fromagers dont le format est beaucoup plus petit. Or, les différences de niveaux des principaux groupes microbiens et d'abondance relative des populations bactériennes étaient faibles entre les fromages affinés issus des deux systèmes. En conditions contrôlées, les fabrications standardisées supposent l'ajout de ferments lactiques et d'affinage à des doses importantes qui doivent largement contribuer à limiter les effets des systèmes de production. D'autre part, en termes d'analyse statistique, le risque de ne pas voir d'effet significatif des systèmes de production est élevé lorsque le nombre de répétitions est faible et effectué sur plusieurs jours en raison des contraintes matérielles.

Dans le dispositif 2, nous avons constaté que les fromages fabriqués à partir de deux crèmes de composition en acides gras différente avec un lait écrémé de même composition microbiologique et biochimique ne se différenciaient pas en termes de flaveur. La composition de la matière grasse

semble donc jouer un rôle mineur dans le développement de la flaveur. Premièrement, la modification des équilibres microbiens dans la pâte et la croûte des fromages était sans doute trop faible pour entraîner des différences dans le développement de la flaveur des fromages. Deuxièmement, ces différences n'affectaient peut-être pas l'abondance ou les activités métaboliques des microorganismes impliqués dans le développement de la flaveur. Troisièmement, il pourrait exister une redondance des fonctions métaboliques impliquées dans la production de composés d'arôme au sein du microbiote qui expliquerait que la flaveur ne soit pas affectée malgré la modification des équilibres bactériens et fongiques. Pour confirmer ces hypothèses, il faudrait cependant pouvoir déterminer l'effet des systèmes sur les microorganismes métaboliquement actifs, et plus particulièrement leur rôle dans les différentes voies métaboliques par metatranscriptomique (en ciblant ARNr 16S ou en étudiant l'expression différentielle du génome complet des microorganismes dominants) ou par qPCR en ciblant des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras.

2.2. Texture

Entre les deux systèmes de production au pâturage (extensif *versus* semi-intensif), les caractéristiques des prairies pâturées (diversité botanique, stade de maturité de l'herbe) et la complémentation en concentrés ont eu un effet sur la texture des fromages. En effet, la texture des fromages fabriqués à partir du lait des vaches du système extensif était plus fondante et plus collante que celle des fromages issus du système semi-intensif. Les deux systèmes ont eu un effet sur les principaux facteurs connus pour être impliqués dans les variations de texture, c'est-à-dire la teneur en matière grasse, la protéolyse, la minéralisation et la composition en acides gras (Fox et al., 2004). Les effets confondus de ces différents facteurs n'ont pas permis de mettre en évidence l'effet propre de la matière grasse laitière. Les différences de profils en acides gras des laits issus de chaque système étaient limitées puisque l'alimentation des vaches des deux systèmes comprenait essentiellement de l'herbe pâturée.

Dans le dispositif 2, la teneur en matière grasse a été standardisée mais nous avons maximisé les différences de composition en acides gras des deux crèmes qui ont chacune été mélangées au même lait écrémé. Ainsi, nous avons confirmé que l'effet de l'alimentation des vaches sur la texture des fromages était particulièrement lié à la composition de la matière grasse *via* les concentrations en C18:1*cis*9 et C16:0 qui sont respectivement les principaux AGMI et AGS avec des points de fusion élevé et faible. En effet, la texture des fromages avec une crème issue des vaches conduites au pâturage (plus riche en C18:1*cis*9 et en AGPI) était moins ferme, plus souple, plus fondante et plus collante que celle des fromages avec une crème issue des vaches nourries à base d'ensilage de maïs (plus riche en AGS à chaîne courte et en C16:0).

2.3. Apparence

L'alimentation du système de pâturage semi-intensif a eu pour conséquence une augmentation de la quantité de boutoné sur la croûte des fromages par rapport aux fromages issus du système extensif, les premiers étant caractérisés par une matière grasse laitière plus riche en AGS. Coppa et al. (2011a) avaient déjà fait cette observation sur la croûte des fromages de type Cantal avec une teneur plus faible en AGPI. L'aspect de la croûte des fromages à pâte pressée non cuite, groupe auquel appartient notre fromage modèle, est très peu étudié contrairement à celui des fromages à pâte molle et à croûte fleurie ou à croûte lavée (Bockelmann, 2010; Galaup et al., 2007; Goerges et al., 2008; Irlinger and Mounier, 2009; Mounier et al., 2008). Ces études ont montré que l'aspect de la croûte dépendait principalement des microorganismesensemencés sur celle-ci. La présence des microorganismes les plus lipolytiques sur la croûte des fromages nous amène à penser que l'interaction entre la matière grasse laitière et la communauté microbienne est plus marquée sur la croûte des fromages que dans la pâte. Les propriétés anti-microbiennes des acides gras libres comme les AGS à moyenne chaîne (dont C12:0 est le plus actif) et les AGI à longue chaîne (dont C18:2n-6 est le plus actif) ont été démontrées *in vitro* depuis plusieurs années (Bergsson et al., 2011; Kabara et al., 1972; Nieman, 1954) et pourraient modifier la dynamique microbienne à la surface des fromages, et par conséquent l'aspect de la croûte des fromages.

Pour tester cette hypothèse, nous avons fabriqué des fromages à partir de deux crèmes de composition en acides gras différente et du même lait écrémé issu des vaches conduites au pâturage. Globalement, la crème issue des vaches conduites au pâturage était plus riche en AGI et C18:3n-3 alors que celle issue des vaches nourries à l'ensilage de maïs était plus riche en AGS et C18:2n-6. Sur les fromages au lait cru, nous avons observé que la quantité et la densité du boutoné étaient plus élevées sur la croûte des fromages avec une crème riche en AGS (lot « ensilage de maïs ») que sur celle des fromages avec une crème riche en AGI (lot « pâturage ») ce qui est en accord avec nos précédents résultats. Ces différences observées particulièrement sur la croûte des fromages au lait cru suggèrent que les ferments mais aussi le microbiote autochtone du lait interviennent dans la formation du boutoné. Les niveaux des principaux groupes microbiens dans la pâte des fromages n'ont pas été modifiés par la composition en acides gras des crèmes comme montré précédemment par Buchin et al. (1998) pour des fromages à pâte pressée non cuite de type Morbier. Pour comprendre l'interaction entre la composition de la matière grasse laitière et la communauté microbienne du lait sur la croûte des fromages, nous avons étudié pour la première fois les équilibres bactériens et fongiques de la croûte des fromages à pâte pressée non cuite au cours de l'affinage par « metabarcoding » (ARNr 16S et ITS2). Nous avons constaté que la composition en acides gras de la matière grasse laitière de la croûte des fromages pouvait modifier les équilibres entre les populations microbiennes autochtones

et les espècesensemencées comme ferments lactiques ou d'affinage. En particulier, la croûte des fromages riches en AGS et C18:2*n*-6 semblait plus favorable à la croissance des ferments impliqués dans la formation du boutoné (*S. casei*) et à d'autres ferments comme *P. fuscoglaucum* et *L. lactis*, tandis que sur la croûte des fromages riche en AGI et en C18:3*n*-3, nous avons observé une plus grande diversité fongique et la présence d'espèces sous-dominantes en abondance plus élevée. Ces résultats nous conduisent à nous interroger sur l'adaptation des souches sélectionnées et employées comme ferments par rapport à la composition biochimique du lait, et plus particulièrement de sa matière grasse. Les capacités de colonisation et de compétition de ces souches vis-à-vis des populations microbiennes autochtones pourraient être modulées par la composition de la matière grasse. Nous avons montré pour la première fois que la lipolyse était plus intense sur la croûte que dans la pâte des fromages. Nous supposons que les acides gras libres insaturés à longue chaîne, en particulier CLA et C18:3*n*-3 dont les teneurs étaient plus élevées sur les fromages riches en AGI, pourraient avoir un effet inhibiteur sur la croissance des ferments d'affinage ce qui se traduit par une croûte plus fine de ces fromages riches en AGI.

Cette thèse apporte des connaissances nouvelles sur l'effet de la composition de la matière grasse laitière sur les équilibres microbiens et le développement des caractéristiques sensorielles des fromages, et plus spécifiquement sur l'influence des deux composantes biochimique et microbiologique sur l'aspect de la croûte des fromages affinés.

Afin de déterminer l'effet propre du microbiote du lait sur les éventuelles modifications de la composition de la matière grasse laitière, et l'effet de leur interaction sur la construction des caractéristiques sensorielles des fromages affinés, un dispositif plus contraignant, sur le principe du dispositif 2, pourrait être mis en œuvre en croisant les deux crèmes pasteurisées avec les deux laits écrémés contenant les microorganismes. Dans un tel dispositif, il serait judicieux de maximiser les différences de composition du microbiote du lait. Pour cela, il faudrait avoir une connaissance préalable de l'évolution de la structure des communautés microbiennes au cours du temps dans les systèmes de production de lait étudiés. Nous pourrions ensuite valider nos résultats sur un autre modèle fromager pour lequel la lipolyse est plus importante en raison des microorganismes présents, comme les fromages à pâte persillée.

Ce travail est l'un des premiers à prendre en considération à la fois les composantes biochimique et microbiologique du lait dans une étude globale allant de l'alimentation des vaches au pâturage jusqu'aux fromages. En démontrant l'existence d'interaction entre ces deux composantes, nous corroborons le fait que l'élaboration des caractéristiques sensorielles des fromages au lait cru est un processus complexe. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives de recherche dans cette voie mais

aussi des applications pratiques concernant le développement de ferments adaptés aux caractéristiques des laits. En effet, nous pourrions nous pencher sur les critères considérés dans la sélection des ferments et sur les facteurs de leur adaptation dans les fromages en fonction de la composition biochimique du lait, et ainsi, imaginer que les ferments soient différents en fonction de l'alimentation des vaches laitières (ration hivernale ou herbe pâturée).

Références

A

- Agabriel, C., Martin, B., Sibra, C., Bonnefoy, J.-C., Montel, M.-C., Didienné, R., Hulin, S., 2004. Effect of dairy production systems on the sensory characteristics of Cantal cheeses: a plant-scale study. *Anim. Res.* 53, 14. doi:10.1051/animres:2004013
- 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 Microbiol.* 44, 136–141. doi:10.1016/j.fm.2014.05.022
- Alegría, Á., Szczesny, P., Mayo, B., Bardowski, J., Kowalczyk, M., 2012. Biodiversity in Oscypek, a Traditional Polish Cheese, Determined by Culture-Dependent and -Independent Approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1890–1898. doi:10.1128/AEM.06081-11
- Alessandria, V., Ferrocino, I., Filippis, F.D., Fontana, M., Rantsiou, K., Ercolini, D., Cocolin, L., 2016. Microbiota of an Italian Grana like cheese during manufacture and ripening unraveled by 16S rRNA-based approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.00999-16
- Alessandria, V., Dolci, P., Rantsiou, K., Pattono, D., Dalmasso, A., Civera, T., Cocolin, L., 2010. Microbiota of the Planalto de Bolona. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 2211–2221. doi:10.1007/s11274-010-0406-7
- Almeida, M., Hébert, A., Abraham, A.-L., Rasmussen, S., Monnet, C., Pons, N., Delbès, C., Loux, V., Batto, J.-M., Leonard, P., Kennedy, S., Ehrlich, S.D., 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, 1101. doi:10.1186/1471-2164-15-1101
- Almena-Aliste, M., Mietton, B., 2014. Cheese Classification, Characterization, and Categorization: A Global Perspective, in: *Cheese and Microbes*. American Society Microbiology, pp. 39-71
- Altieri, C., Cardillo, D., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., 2007. Inhibition of *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by Fatty Acids and Their Monoglycerides. *J. Food Prot.* 70, 1206–1212.
- Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143–169.
- Anderson, I.C., Cairney, J.W.G., 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ. Microbiol.* 6, 769–779. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00675
- Ansorge, W.J., 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnol.* 25, 195–203. doi:10.1016/j.nbt.2008.12.009
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., de Jong, C., Wouters, J.T.M., Smit, G., 1999. Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *Int. Dairy J.* 9, 725–735. doi:10.1016/S0958-6946(99)00140-5

B

- Banks, J.M., Brechany, E.Y., Christie, W., 1989. The production of low fat Cheddar-type cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 42, 6–9. doi:10.1111/j.1471-0307.1989.tb01699
- Bardou, P., Mariette, J., Escudié, F., Djemiel, C., Klopp, C., 2014. jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics* 15, 293. doi:10.1186/1471-2105-15-293
- Bargo, F., Delahoy, J.E., Schroeder, G.F., Muller, L.D., 2006. Milk fatty acid composition of dairy cows grazing at two pasture allowances and supplemented with different levels and sources of concentrate. *Anim. Feed Sci. Technol.* 125, 17–31. doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.05.010
- Bassi, D., Puglisi, E., Coconcelli, P.S., 2015. Understanding the bacterial communities of hard cheese with blowing defect. *Food Microbiol.* 52, 106–118. doi:10.1016/j.fm.2015.07.004
- Belviso, S., Giordano, M., Ambrosoli, R., Minati, J.L., Bertolino, M., Zeppa, G., 2013. Assessment of lactic acid bacteria sensitivity to terpenoids with the Biolog methodology. *Dairy Sci. Technol.* 94, 195–203. doi:10.1007/s13594-013-0151-4
- Bengtsson-Palme, J., Ryberg, M., Hartmann, M., Branco, S., Wang, Z., Godhe, A., De Wit, P., Sánchez-García, M., Ebersberger, I., de Sousa, F., Amend, A., Jumpponen, A., Unterseher, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Bertrand, Y.J.K., Sanli, K., Eriksson, K.M., Vik, U., Veldre, V., Nilsson, R.H., 2013. Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods Ecol. Evol.* 4, 914–919. doi:10.1111/2041-210X.12073
- Bent, S.J., Forney, L.J., 2008. The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *ISME J.* 2, 689–695. doi:10.1038/ismej.2008.44

- Bergsson, G., Hilmarrsson, H., Thormar, H., 2011. Antibacterial, antiviral and antifungal activities of lipids, in: *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. John Wiley & Sons, pp. 47–80.
- Bockelmann, W., 2010. Secondary cheese starter cultures, in: *Technology of Cheesemaking*, Oxford: Wiley-Blackwell. Law B.A., Tamime A.Y., pp. 193–230.
- Bokulich, N.A., Mills, D.A., 2013a. Facility-Specific “House” Microbiome Drives Microbial Landscapes of Artisan Cheesemaking Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5214–5223. doi:10.1128/AEM.00934-13
- Bokulich, N.A., Mills, D.A., 2013b. Improved Selection of Internal Transcribed Spacer-Specific Primers Enables Quantitative, Ultra-High-Throughput Profiling of Fungal Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2519–2526. doi:10.1128/AEM.03870-12
- Bokulich, N.A., Mills, D.A., 2012. Next-generation approaches to the microbial ecology of food fermentations. *BMB Rep.* 45, 377–389. doi:10.5483/BMBRep.2012.45.7.148
- Bovolenta, S., Romanzin, A., Corazzin, M., Spanghero, M., Aprea, E., Gasperi, F., Piasentier, E., 2014. Volatile compounds and sensory properties of Montasio cheese made from the milk of Simmental cows grazing on alpine pastures. *J. Dairy Sci.* 97, 7373–7385. doi:10.3168/jds.2014-8396
- Boyaval, P., Corre, C., Dupuis, C., Roussel, E., 1995. Effects of free fatty acids on propionic acid bacteria. *Le Lait* 75, 17–29. doi:10.1051/lait:199512
- Braem, G., De Vlieghe, S., Verbist, B., Heyndrickx, M., Leroy, F., De Vuyst, L., 2012. Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity. *Vet. Microbiol.* 157, 383–390. doi:10.1016/j.vetmic.2011.12.031
- Broadbent, J.R., Brighton, C., McMahon, D.J., Farkye, N.Y., Johnson, M.E., Steele, J.L., 2013. Microbiology of Cheddar cheese made with different fat contents using a *Lactococcus lactis* single-strain starter. *J. Dairy Sci.* 96, 4212–4222. doi:10.3168/jds.2012-6443
- Buchin, S., Delague, V., Duboz, G., Berdague, J.L., Beuvier, E., Pochet, S., Grappin, R., 1998. Influence of Pasteurization and Fat Composition of Milk on the Volatile Compounds and Flavor Characteristics of a Semi-hard Cheese. *J. Dairy Sci.* 81, 3097–3108. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75874-6
- Buchin, S., Martin, B., Dupont, D., Bornard, A., Achilleos, C., 1999. Influence of the composition of Alpine highland pasture on the chemical, rheological and sensory properties of cheese. *J. Dairy Res.* 66, 579–588.
- Bugaud, C., Buchin, S., Coulon, J.-B., Hauwuy, A., Dupont, D., 2001a. Influence of the nature of alpine pastures on plasmin activity, fatty acid and volatile compound composition of milk. *Le Lait* 81, 14. doi:10.1051/lait:2001140
- Bugaud, C., Buchin, S., Hauwuy, A., Coulon, J.-B., 2001b. Relationships between flavour and chemical composition of Abondance cheese derived from different types of pastures. *Le Lait* 81, 18. doi:10.1051/lait:2001162
- Bugaud, C., Buchin, S., Noël, Y., Tessier, L., Pochet, S., Martin, B., Chamba, J.F., 2001c. Relationships between Abondance cheese texture, its composition and that of milk produced by cows grazing different types of pastures. *Le Lait* 81, 16. doi:10.1051/lait:2001152

C

- Callon, C., Saubusse, M., Didienné, R., Buchin, S., Montel, M.-C., 2011. Simplification of a complex microbial antilisterial consortium to evaluate the contribution of its flora in uncooked pressed cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 379–389. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.019
- Callon, C., Delbès, C., Duthoit, F., Montel, M.-C., 2006. Application of SSCP–PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 172–180. doi:10.1016/j.syapm.2005.07.008
- Chamberlain, N.R., Mehrtens, B.G., Xiong, Z., Kapral, F.A., Boardman, J.L., Rearick, J.I., 1991. Correlation of carotenoid production, decreased membrane fluidity, and resistance to oleic acid killing in *Staphylococcus aureus* 18Z. *Infect. Immun.* 59, 4332–4337.
- Chao, A., 1984. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scand. J. Stat.* 11, 265–270.
- 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. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109, 828–855. doi:10.1002/ejlt.200700080
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Doreau, M., 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow’s diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livest. Prod. Sci., Fifth International Workshop on the Biology of Lactation in Farm Animals* 70, 31–48. doi:10.1016/S0301-6226(01)00196-8
- Cihlar, R.L., Sypherd, P.S., 1980. The organization of the ribosomal RNA genes in the fungus *Mucor racemosus*. *Nucleic Acids Res.* 8, 793–804.

- Cogan, T.M., Goerges, S., Gelsomino, R., Larpin, S., Hohenegger, M., Bora, N., Jamet, E., Rea, M.C., Mounier, J., Vancanneyt, M., Guéguen, M., Desmasures, N., Swings, J., Goodfellow, M., Ward, A.C., Sebastiani, H., Irlinger, F., Chamba, J.-F., Beduhn, R., Scherer, S., 2014. Biodiversity of the Surface Microbial Consortia from Limburger, Reblochon, Livarot, Tilsit, and Gubbeen Cheeses. *Microbiol. Spectr.* doi:10.1128/microbiolspec.CM-0010-2012
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G., 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int. Dairy J.* 13, 841–866. doi:10.1016/S0958-6946(03)00109-2
- Collomb, M., Bütikofer, U., Sieber, R., Jeangros, B., Bosset, J.-O., 2002. Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography. *Int. Dairy J.* 12, 649–659. doi:10.1016/S0958-6946(02)00061-4
- Coppa, M., Ferlay, A., Borreani, G., Revello-Chion, A., Tabacco, E., Tornambé, G., Pradel, P., Martin, B., 2015. Effect of phenological stage and proportion of fresh herbage in cow diets on milk fatty acid composition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 208, 66–78. doi:10.1016/j.anifeedsci.2015.07.006
- Coppa, M., Ferlay, A., Monsallier, F., Verdier-Metz, I., Pradel, P., Didienne, R., Farruggia, A., Montel, M.C., Martin, B., 2011a. Milk fatty acid composition and cheese texture and appearance from cows fed hay or different grazing systems on upland pastures. *J. Dairy Sci.* 94, 1132–1145. doi:10.3168/jds.2010-3510
- Coppa, M., Verdier-Metz, I., Ferlay, A., Pradel, P., Didienne, R., Farruggia, A., Montel, M.C., Martin, B., 2011b. Effect of different grazing systems on upland pastures compared with hay diet on cheese sensory properties evaluated at different ripening times. *Int. Dairy J.* 21, 815–822. doi:10.1016/j.idairyj.2011.04.006
- Cornu, A., Rabiau, N., Kondjoyan, N., Verdier-Metz, I., Pradel, P., Tournayre, P., Berdagué, J.L., Martin, B., 2009. Odour-active compound profiles in Cantal-type cheese: Effect of cow diet, milk pasteurization and cheese ripening. *Int. Dairy J.* 19, 588–594. doi:10.1016/j.idairyj.2009.04.008
- Corrieu, G., Luquet, F.-M., 2008. Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments. Lavoisier.
- Costilow, R.N., Speck, M.L., 1951. Inhibition of *Streptococcus Lactis* in Milk by Fatty Acids. *J. Dairy Sci.* 34, 1104–1110. doi:10.3168/jds.S0022-0302(51)91832-2
- Coulon, J.-B., Delacroix-Buchet, A., Martin, B., Pirisi, A., 2004. Relationships between ruminant management and sensory characteristics of cheeses: a review. *Le Lait* 84, 21. doi:10.1051/lait:2004008
- Couvreur, S., Hurtaud, C., Marnet, P.G., Faverdin, P., Peyraud, J.L., 2007. Composition of Milk Fat from Cows Selected for Milk Fat Globule Size and Offered Either Fresh Pasture or a Corn Silage-Based Diet. *J. Dairy Sci.* 90, 392–403. doi:10.3168/jds.S0022-0302(07)72640-1
- Couvreur, S., Hurtaud, C., Lopez, C., Delaby, L., Peyraud, J.L., 2006. The Linear Relationship Between the Proportion of Fresh Grass in the Cow Diet, Milk Fatty Acid Composition, and Butter Properties. *J. Dairy Sci.* 89, 1956–1969. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72263-9

D

- Dalmasso, A., Soto del Rio, M. de los D., Civera, T., Pattono, D., Cardazzo, B., Bottero, M.T., 2016. Characterization of microbiota in Plaisentif cheese by high-throughput sequencing. *LWT - Food Sci. Technol.* 69, 490–496. doi:10.1016/j.lwt.2016.02.004
- Davidson, P.M., Sofos, J.N., Brannen, A.L., 2005. *Antimicrobials in Food*, Third Edition. CRC Press.
- De Filippis, F., Genovese, A., Ferranti, P., Gilbert, J.A., Ercolini, D., 2016. Metatranscriptomics reveals temperature-driven functional changes in microbiome impacting cheese maturation rate. *Sci. Rep.* 6. doi:10.1038/srep21871
- De Filippis, F., La Stora, A., Stellato, G., Gatti, M., Ercolini, D., 2014. A Selected Core Microbiome Drives the Early Stages of Three Popular Italian Cheese Manufactures. *PLoS ONE* 9. doi:10.1371/journal.pone.0089680
- De Jong, C. and Badings, H.T., 1990. Determination of free fatty acids in milk and cheese procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis. *J. High Resol. Chromatogr.*, 13, 94–98. doi:10.1002/jhrc.1240130204
- De Pasquale, I., Di Cagno, R., Buchin, S., De Angelis, M., Gobbetti, M., 2016. Spatial Distribution of the Metabolically Active Microbiota within Italian PDO Ewes' Milk Cheeses. *PLoS ONE* 11. doi:10.1371/journal.pone.0153213
- Deeth, H.C., Fitz-Gerald, C.H., 1983. Lipolytic Enzymes and Hydrolytic Rancidity in Milk and Milk Products, in: *Developments in Dairy Chemistry*. pp. 195–239.
- Delbès, C., Monnet, C., Irlinger, F., 2015. Des communautés microbiennes au service de la qualité des fromages : diversité et dynamique adaptative et fonctionnelle des populations endogènes etensemencées. *Innov. Agron.* 44, 69–86.

- Delcenserie, V., Taminiau, B., Delhalle, L., Nezer, C., Doyen, P., Crevecœur, 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, 6046–6056. doi:10.3168/jds.2014-8225
- Denis, C., Desmasures, N., Lohéac, C., Guéguen, M., 2004. Etude du lien entre la nature de la flore prairiale et les caractéristiques des laits crus normands (rapport d'étude), Influence de cette diversité sur la qualité des produits laitiers. Adria Normandie.
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L., 2006. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5069–5072. doi:10.1128/AEM.03006-05
- Desbois, A.P., Smith, V.J., 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1629–1642. doi:10.1007/s00253-009-2355-3
- Dewhurst, R.J., Shingfield, K.J., Lee, M.R.F., Scollan, N.D., 2006. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Anim. Feed Sci. Technol.*, Special Issue: Modifying Milk Composition 131, 168–206. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.04.016
- 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. *Int. J. Food Microbiol.* 156, 91–101. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.007
- 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. *Int. J. Food Microbiol.* 185, 127–135. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.05.021
- Driessen, F.M., 1989. Heat-induced changes in milk. *Bull. Int. Dairy Fed.* 238.
- 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., Bonnarme, P., 2015. Overview of a Surface-Ripened Cheese Community Functioning by Meta-Omics Analyses. *PLOS ONE* 10. doi:10.1371/journal.pone.0124360
- Dunn, H.C., Lindsay, R.C., 1985. Evaluation of the Role of Microbial Strecker-Derived Aroma Compounds in Unclean-Type Flavors of Cheddar Cheese. *J. Dairy Sci.* 68, 2859–2874. doi:10.3168/jds.S0022-0302(85)81179-6

E

- Ercolini, D., 2013. High-Throughput Sequencing and Metagenomics: Moving Forward in the Culture-Independent Analysis of Food Microbial Ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3148–3155. doi:10.1128/AEM.00256-13
- Ercolini, D., Filippis, F.D., Stora, A.L., Iacono, M., 2012. “Remake” by High-Throughput Sequencing of the Microbiota Involved in the Production of Water Buffalo Mozzarella Cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8142–8145. doi:10.1128/AEM.02218-12
- Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G., Coppola, S., 2001. The Potential of a Polyphasic PCR-DGGE Approach in Evaluating Microbial Diversity of Natural Whey Cultures for Water-Buffered Mozzarella Cheese Production: Bias of Culture-Dependent and Culture-Independent Analyses. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 610–617. doi:10.1078/0723-2020-00076
- Escobar-Zepeda, A., Sanchez-Flores, A., Quirasco Baruch, M., 2016. Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiol.* 57, 116–127. doi:10.1016/j.fm.2016.02.004

F

- Falentin, H., Rault, L., Nicolas, A., Bouchard, D.S., Lassalas, J., Lamberton, P., Aubry, J.-M., Marnet, P.-G., Le Loir, Y., Even, S., 2016. Bovine Teat Microbiome Analysis Revealed Reduced Alpha Diversity and Significant Changes in Taxonomic Profiles in Quarters with a History of Mastitis. *Syst. Microbiol.* 480. doi:10.3389/fmicb.2016.00480
- Fenelon, M.A., O'Connor, P., Guinee, T.P., 2000. The Effect of Fat Content on the Microbiology and Proteolysis in Cheddar Cheese During Ripening. *J. Dairy Sci.* 83, 2173–2183. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)75100-9
- Ferlay, A., Doreau, M., Martin, C., Chilliard, Y., 2013. Effects of incremental amounts of extruded linseed on the milk fatty acid composition of dairy cows receiving hay or corn silage. *J. Dairy Sci.* 96, 6577–6595. doi:10.3168/jds.2013-6562

- Ferlay, A., Martin, B., Lerch, S., Gobert, M., Pradel, P., Chilliard, Y., 2010. Effects of supplementation of maize silage diets with extruded linseed, vitamin E and plant extracts rich in polyphenols, and morning v. evening milking on milk fatty acid profiles in Holstein and Montbéliarde cows. *Animal* 4, 627–640. doi:10.1017/S1751731109991224
- Ferlay, A., Agabriel, C., Sibra, C., Journal, C., Martin, B., Chilliard, Y., 2008. Tanker milk variability in fatty acids according to farm feeding and husbandry practices in a French semi-mountain area. *Dairy Sci. Technol.* 88, 193–215. doi:10.1051/dst:2007013
- Ferlay, A., Martin, B., Pradel, P., Coulon, J.B., Chilliard, Y., 2006. Influence of Grass-Based Diets on Milk Fatty Acid Composition and Milk Lipolytic System in Tarentaise and Montbéliarde Cow Breeds. *J. Dairy Sci.* 89, 4026–4041. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72446-8
- Fleet, G. h., 1990. Yeasts in dairy products. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 199–211. doi:10.1111/j.1365-2672.1990.tb02566.x
- Fogel, G.B., Collins, C.R., Li, J., Brunk, C.F., 1999. Prokaryotic Genome Size and SSU rDNA Copy Number: Estimation of Microbial Relative Abundance from a Mixed Population. *Microb. Ecol.* 38, 93–113. doi:10.1007/s002489900162
- Foster, E.M., Nelson, F.E., Speck, M.L., Doetsch, R.N., Olson, J.C., Jr., 1957. *Dairy microbiology*. Prentice-Hall Inc., New Jersey, USA.
- Fox, P.F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P.L.H., O’Mahony, J.A., 2015. Milk Lipids, in: *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer International Publishing, pp. 69–144. doi:10.1007/978-3-319-14892-2_3
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P., 2004. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: General Aspects*. Academic Press.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. Springer Science & Business Media, Gaithersburg, MD, USA.
- Fox, P.F., Wallace, J.M., 1997. Formation of flavor compounds in cheese. *Adv. Appl. Microbiol.* 45, 17–85.
- Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A., Poznanski, E., 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows’ milk. *Int. Dairy J.* 19, 3–11. doi:10.1016/j.idairyj.2008.07.008
- Frétin, M., Ferlay, A., Verdier-Metz, I., Fournier, F., Montel, M.-C., Farruggia, A., Delbès, C., Martin, B., 2017. The effects of low-input grazing systems and milk pasteurisation on the chemical composition, microbial communities, and sensory properties of uncooked pressed cheeses. *Int. Dairy J.* doi:10.1016/j.idairyj.2016.09.007
- Fricker, M., Skånseng, 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. *Int. J. Food Microbiol.*, Improved biotraceability of unintended microorganisms and their substances in food and feed chains 145, Supplement 1, S24–S30. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.025
- Fuka, M.M., Wallisch, S., Engel, M., Welzl, G., Havranek, J., Schloter, M., 2013. Dynamics of Bacterial Communities during the Ripening Process of Different Croatian Cheese Types Derived from Raw Ewe’s Milk Cheeses. *PLOS ONE* 8, e80734. doi:10.1371/journal.pone.0080734

G

- Galaup, P., Gautier, A., Piriou, Y., Villeblanche, A. de, Valla, A., Dufossé, L., 2007. First pigment fingerprints from the rind of French PDO red-smear ripened soft cheeses Epoisses, Mont d’Or and Maroilles. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 4th International Congress on Pigments in Food: Pigments in Food - A Challenge to Life Sciences 8, 373–378. doi:10.1016/j.ifset.2007.03.017
- Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Cogan, T.M., Condon, S., Swings, J., 2002. Source of Enterococci in a Farmhouse Raw-Milk Cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3560–3565. doi:10.1128/AEM.68.7.3560-3565.2002
- Giaccone, D., Revello-Chion, A., Galassi, L., Bianchi, P., Battelli, G., Coppa, M., Tabacco, E., Borreani, G., 2016. Effect of milk thermisation and farming system on cheese sensory profile and fatty acid composition. *Int. Dairy J.* 59, 10–19. doi:10.1016/j.idairyj.2016.02.047
- 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. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 471–481. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00091
- Glasser, F., Ferlay, A., Chilliard, Y., 2008. Oilseed Lipid Supplements and Fatty Acid Composition of Cow Milk: A Meta-Analysis. *J. Dairy Sci.* 91, 4687–4703. doi:10.3168/jds.2008-0987
- 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
- Grappin, R., Beuvier, E., 1997. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *Int. Dairy J.* 7, 751–761. doi:10.1016/S0958-6946(98)00006-5
- Grundy, S.M., Denke, M.A., 1990. Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J. Lipid Res.* 31, 1149–1172.
- Guidone, A., Zotta, T., Matera, A., Ricciardi, A., De Filippis, F., Ercolini, D., Parente, E., 2016. The microbiota of high-moisture mozzarella cheese produced with different acidification methods. *Int. J. Food Microbiol.* 216, 9–17. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.002

H

- Hagi, T., Kobayashi, M., Nomura, M., 2010. Molecular-Based Analysis of Changes in Indigenous Milk Microflora during the Grazing Period. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 484–487. doi:10.1271/bbb.90470
- Harmon, L.G., Nelson, F.E., 1957. Interrelationships of Microorganisms in Cream. II. *Lactobacillus casei*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus lactis*. *J. Dairy Sci.* 40, 1–10. doi:10.3168/jds.S0022-0302(57)94434-X
- Hauerlandová, I., Lorencová, E., Buňka, F., Navrátil, J., Janečková, K., Buňková, L., 2014. The influence of fat and monoacylglycerols on growth of spore-forming bacteria in processed cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 182–183, 37–43. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.027
- Hickey, C.D., Sheehan, J.J., Wilkinson, M.G., Auty, M.A.E., 2015. Growth and location of bacterial colonies within dairy foods using microscopy techniques: a review. *Front. Microbiol.* 6, 1–8. doi:10.3389/fmicb.2015.00099
- Holzapfel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U., 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 343–362. doi:10.1016/0168-1605(94)00036-6
- Hurtaud, C., Peyraud, J.L., Michel, G., Berthelot, D., Delaby, L., 2009. Winter feeding systems and dairy cow breed have an impact on milk composition and flavour of two Protected Designation of Origin French cheeses. *Animal* 3, 1327–1338. doi:10.1017/S1751731109004716
- Hurtaud, C., Delaby, L., Peyraud, J.L., Durand, J.L., Emile, J.C., Huyghe, C., Lemaire, G., 2002. Evolution of milk composition and butter properties during the transition between winter-feeding and pasture, in: *Multi-Function Grasslands: Quality Forages, Animal Products and Landscapes*. Presented at the Proceedings of the 19th General Meeting of the European Grassland Federation, Organizing Committee of the European Grassland Federation, La Rochelle, France, pp. 574–575.
- Hurtaud, C., Buchin, S., Martin, B., Verdier-Metz, I., Peyraud, J.L., Noel, Y., 2001. La qualité des laits et ses conséquences sur la qualité des produits de transformation : quelques techniques de mesure dans les essais zootechniques. *Rencontres Rech. Rumin.* 8, 35–42

I

- 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., Mounier, J., 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Curr. Opin. Biotechnol., Food biotechnology / Plant biotechnology* 20, 142–148. doi:10.1016/j.copbio.2009.02.016

J

- Jany, J.-L., Barbier, G., 2008. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiol.* 25, 839–848. doi:10.1016/j.fm.2008.06.003
- Josefsen, M.H., Löfström, C., Hansen, T.B., Christensen, L.S., Olsen, J.E., Hoorfar, J., 2010. Rapid Quantification of Viable *Campylobacter* Bacteria on Chicken Carcasses, Using Real-Time PCR and Propidium Monoazide Treatment, as a Tool for Quantitative Risk Assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5097–5104. doi:10.1128/AEM.00411-10
- Joshi, N., Fass, J., 2011. Sickie: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33).
- Justé, A., Thomma, B.P.H.J., Lievens, B., 2008. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiol.* 25, 745–761.

K

- Kabara, J.J., Marshall, D.L., 2005. Medium-chain fatty acids and esters, in: *Antimicrobials in Food*. CRC Press, p. 720.
- Kabara, J.J., Vrable, R., Jie, M.S.F.L.K., 1977. Antimicrobial lipids: Natural and synthetic fatty acids and monoglycerides. *Lipids* 12, 753–759. doi:10.1007/BF02570908
- Kabara, J.J., Swieczkowski, D.M., Conley, A.J., Truant, J.P., 1972. Fatty Acids and Derivatives as Antimicrobial Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2, 23–28. doi:10.1128/AAC.2.1.23
- Kable, M.E., Srisengfa, Y., Laird, M., Zaragoza, J., McLeod, J., Heidenreich, J., Marco, M.L., 2016. The Core and Seasonal Microbiota of Raw Bovine Milk in Tanker Trucks and the Impact of Transfer to a Milk Processing Facility. *mBio* 7. doi:10.1128/mBio.00836-16
- Kagkli, D. m., Vancanneyt, M., Vandamme, P., Hill, C., Cogan, T. m., 2007. Contamination of milk by enterococci and coliforms from bovine faeces. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1393–1405. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03338
- Kairúz, M.S.N. de, Oliver, G., Holgado, A.P. de R., Fariás, R.N., 1983. Isolation of mutants of *Lactobacillus* bacteria, grown in skim milk, that resist fatty acid inhibition. *Curr. Microbiol.* 8, 169–172. doi:10.1007/BF01568852
- Kato, N., Shibasaki, I., 1975. Comparison of antimicrobial activities of fatty acids and their esters. *J. Ferment. Technol.* 53.
- Kay, J.K., Weber, W.J., Moore, C.E., Bauman, D.E., Hansen, L.B., Chester-Jones, H., Crooker, B.A., Baumgard, L.H., 2005. Effects of Week of Lactation and Genetic Selection for Milk Yield on Milk Fatty Acid Composition in Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 88, 3886–3893. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)73074-5
- Kelsey, J.A., Corl, B.A., Collier, R.J., Bauman, D.E., 2003. The Effect of Breed, Parity, and Stage of Lactation on Conjugated Linoleic Acid (CLA) in Milk Fat from Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 86, 2588–2597. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73854-5
- Kinderlerer, J.L., Matthias, H.E., Finner, P., 1996. Effect of medium-chain fatty acids in mould ripened cheese on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Res.* 63, 593–606. doi:10.1017/S0022029900032131
- Knapp, H.R., Melly, M.A., 1986. Bactericidal Effects of Polyunsaturated Fatty Acids. *J. Infect. Dis.* 154, 84–94. doi:10.1093/infdis/154.1.84
- Kobayashi, H., Oethinger, M., Tuohy, M.J., Hall, G.S., Bauer, T.W., 2009. Unsuitable distinction between viable and dead *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* by ethidium bromide monoazide. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 633–638. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02585.x
- Kodicek, E., Worden, A.N., 1945. The effect of unsaturated fatty acids on *Lactobacillus helveticus* and other Gram-positive micro-organisms. *Biochem. J.* 39, 78–85.
- Köljal, U., Larsson, K.-H., Abarenkov, K., Nilsson, R.H., Alexander, I.J., Eberhardt, U., Erland, S., Høiland, K., Kjølter, R., Larsson, E., Pennanen, T., Sen, R., Taylor, A.F.S., Tedersoo, L., Vrålstad, T., 2005. UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* 166, 1063–1068. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01376
- Konstantinidis, K.T., Ramette, A., Tiedje, J.M., 2006. The bacterial species definition in the genomic era. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361, 1929–1940. doi:10.1098/rstb.2006.1920
- 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. doi:10.1371/journal.pone.0061959

L

- Laloy, E., Vuilleumard, J.-C., El Soda, M., Simard, R.E., 1996. Influence of the fat content of Cheddar cheese on retention and localization of starters. *Int. Dairy J.* 6, 729–740. doi:10.1016/0958-6946(95)00068-2
- Lê Cao, K.-A., Costello, M.-E., Lakis, V.A., Bartolo, F., Chua, X.-Y., Brazeilles, R., Rondeau, P., 2016. MixMC: A Multivariate Statistical Framework to Gain Insight into Microbial Communities. *PLoS ONE* 11. doi:10.1371/journal.pone.0160169
- Lerch, S., Ferlay, A., Graulet, B., Cirié, C., Verdier-Metz, I., Montel, M.C., Chilliard, Y., Martin, B., 2015. Extruded linseeds, vitamin E and plant extracts in corn silage-based diets of dairy cows: Effects on sensory properties of raw milk and uncooked pressed cheese. *Int. Dairy J.* 51, 65–74. doi:10.1016/j.idairyj.2015.07.006
- Leriche, F., Fayolle, K., 2012. No seasonal effect on culturable pseudomonads in fresh milks from cattle herds. *J. Dairy Sci.* 95, 2299–2306. doi:10.3168/jds.2011-4785

- Leroy, F., De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 67–78. doi:10.1016/j.tifs.2003.09.004
- 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. doi:10.1186/1471-2164-15-235
- Li, W., Godzik, A., 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22, 1658–1659. doi:10.1093/bioinformatics/btl158
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6980–6987. doi:10.1128/AEM.00835-07
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M., 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012. doi:10.1155/2012/251364
- 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 Microbiol.* 15. doi:10.1186/s12866-015-0385-9
- Lopez, C., Briard-Bion, V., Ménard, O., 2014. Polar lipids, sphingomyelin and long-chain unsaturated fatty acids from the milk fat globule membrane are increased in milks produced by cows fed fresh pasture based diet during spring. *Food Res. Int.* 58, 59–68. doi:10.1016/j.foodres.2014.01.049
- Lortal, S., Chapot-Chartier, M.-P., 2005. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *Int. Dairy J., The Fourth IDF Symposium on Cheese: Ripening, Characterization and Technology* 15, 857–871. doi:10.1016/j.idairyj.2004.08.024
- Lucas, A., Agabriel, C., Martin, B., Ferlay, A., Verdier-Metz, I., Coulon, J.-B., Rock, E., 2006a. Relationships between the conditions of cow’s milk production and the contents of components of nutritional interest in raw milk farmhouse cheese. *Le Lait* 86, 177–202. doi:10.1051/lait:2005049
- Lucas, A., Rock, E., Chamba, J.-F., Verdier-Metz, I., Brachet, P., Coulon, J.-B., 2006b. Respective effects of milk composition and the cheese-making process on cheese compositional variability in components of nutritional interest. *Le Lait* 86, 21. doi:10.1051/lait:2005042
- Lusk, T.S., Ottesen, A.R., White, J.R., Allard, M.W., Brown, E.W., Kase, J.A., 2012. Characterization of microflora in Latin-style cheeses by next-generation sequencing technology. *BMC Microbiol.* 12, 254. doi:10.1186/1471-2180-12-254

M

- Magoč, T., Salzberg, S.L., 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27, 2957–2963. doi:10.1093/bioinformatics/btr507
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M., 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2. doi:10.7717/peerj.593
- 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. *Int. Dairy J.* 27, 13–21. doi:10.1016/j.idairyj.2012.07.009
- 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. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 11, 133–147. doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00183.x
- Mardis, E.R., 2008. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9, 387–402. doi:10.1146/annurev.genom.9.081307.164359
- Mariani, C., 2007. Ecologie microbienne des biofilms présents à la surface des planches d’affinage en bois de l’AOC “Reblochon de Savoie” et effet inhibiteur vis à vis de *Listeria monocytogenes*. *Sciences du Vivant*. ENSIA (AgroParisTech).
- Marilley, L., Casey, M.G., 2004. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 139–159. doi:10.1016/S0168-1605(03)00304-0
- Martin, B., Ferlay, A., Hurtaud, C., Graulet, B., Cornu, A., Lefrileux, Y., Lagriffoul, G., Sibra, C., 2014. Les liens entre les conditions de production et les composés d’intérêt nutritionnel du lait, in: *Composés D’intérêt Nutritionnel Du Lait et Des Fromages de Terroir*, RMT Filières Fromagères Valorisant Leur Terroir. CNAOL, pp. 31–58.

- Martin, B., Pomiès, D., Pradel, P., Verdier-Metz, I., Rémond, B., 2009. Yield and sensory properties of cheese made with milk from Holstein or Montbéliarde cows milked twice or once daily. *J. Dairy Sci.* 92, 4730–4737. doi:10.3168/jds.2008-1914
- Martin, B., Verdier-Metz, I., Buchin, S., Hurtaud, C., Coulon, J.-B., 2005. How do the nature of forages and pasture diversity influence the sensory quality of dairy livestock products? *Anim. Sci.* 81, 205–212. doi:10.1079/ASC50800205
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17, 10–12.
- 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, 192–202. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.014
- Masoud, W., Takamiya, M., Vogensen, F.K., Lillevang, S., Al-Soud, W.A., Sørensen, 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. *Int. Dairy J.* 21, 142–148. doi:10.1016/j.idairyj.2010.10.007
- Mayo, B., Rachid, C.T.C.C., Alegría, Á., Leite, A.M.O., Peixoto, R.S., Delgado, S., 2014. Impact of Next Generation Sequencing Techniques in Food Microbiology. *Curr. Genomics* 15, 293–309. doi:10.2174/1389202915666140616233211
- 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 Microbiol.* 46, 121–131. doi:10.1016/j.fm.2014.07.021
- McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Lucey, J.A., Jordan, K.N., Cogan, T.M., 1993. Contribution of the indigenous microflora to the maturation of cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 3, 613–634. doi:10.1016/0958-6946(93)90104-8
- McSweeney, P.L.H., Sousa, M.J., 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait* 80, 32. doi:10.1051/lait:2000127
- Mehta, A., Tatini, S.R., 1994. An Evaluation of the Microbiological Safety of Reduced-Fat Cheddar-like Cheese. *J. Food Prot.* 57, 776–779.
- Michalski, M.-C., Gassi, J.-Y., Famelart, M.-H., Leconte, N., Camier, B., Michel, F., Briard, V., 2003. The size of native milk fat globules affects physico-chemical and sensory properties of Camembert cheese. *Le Lait* 83, 13. doi:10.1051/lait:2003003
- Michel, V., Hauwuy, A., Chamba, J.F., 2006. Gestion de la flore microbienne des laits crus par les pratiques des producteurs. *Rencontres Rech. Rumin.* 309–312.
- Milo, C., Reineccius, G.A., 1997. Identification and Quantification of Potent Odorants in Regular-Fat and Low-Fat Mild Cheddar Cheese. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3590–3594.
- Molimard, P., Spinnler, H.E., 1996. Review: Compounds Involved in the Flavor of Surface Mold-Ripened Cheeses: Origins and Properties. *J. Dairy Sci.* 79, 169–184. doi:10.3168/jds.S0022-0302(96)76348-8
- Monnet, C., Dugat-Bony, E., Swennen, D., Beckerich, J.-M., Irlinger, F., Fraud, S., Bonnarme, P., 2016. Investigation of the Activity of the Microorganisms in a Reblochon-Style Cheese by Metatranscriptomic Analysis. *Front. Microbiol.* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00536
- Monnet, J.C., Berodier, F., Badot, P.M., 2000. Characterization and Localization of a Cheese Georegion Using Edaphic Criteria (Jura Mountains, France). *J. Dairy Sci.* 83, 1692–1704. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)75038-7
- Monsallier, F., Verdier-Metz, I., Agabriel, C., Martin, B., Montel, M.-C., 2012. Variability of microbial teat skin flora in relation to farming practices and individual dairy cow characteristics. *Dairy Sci. Technol.* 92, 265–278. doi:10.1007/s13594-012-0064-7
- 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
- Montel, M.C., Bouton, Y., Praguél, P., 2012. Ecosystèmes des laits et des fromages au lait cru - enjeux pour leur maîtrise. *Rencontres Rech. Rumin.* 19, 233–240
- 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, 172–181. doi:10.1128/AEM.01338-07

Mukdsi, M.C.A., 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 751–756. doi:10.1128/AEM.03640-13

N

- Ndoye, B., Rasolofo, E.A., LaPointe, G., Roy, D., 2011. A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. *Dairy Sci. Technol.* 91, 495–524. doi:10.1007/s13594-011-0031-8
- Nieman, C., 1954. Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. *Bacteriol. Rev.* 18, 147–163.
- Nilsson, R.H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N., Larsson, K.-H., 2008. Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification. *Evol. Bioinforma. Online* 4, 193–201.
- Nozière, P., Graulet, B., Lucas, A., Martin, B., Grolier, P., Doreau, M., 2006. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Anim. Feed Sci. Technol.*, Special Issue: Modifying Milk Composition 131, 418–450. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.06.018

O

- O’Flaherty, S., Klaenhammer, T.R., 2011. The Impact of Omic Technologies on the Study of Food Microbes. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2, 353–371. doi:10.1146/annurev-food-030810-110338
- Olsen, G.J., Overbeek, R., Larsen, N., Marsh, T.L., McCaughey, M.J., Maciukenas, M.A., Kuan, W.-M., Macke, T.J., Xing, Y., Woese, C.R., 1992. The Ribosomal Database Project. *Nucleic Acids Res.* 20, 2199–2200. doi:10.1093/nar/20.suppl.2199
- O’Sullivan, D.J., Cotter, P.D., O’Sullivan, O., Giblin, L., McSweeney, P.L.H., Sheehan, J.J., 2015a. Temporal and Spatial Differences in Microbial Composition during the Manufacture of a Continental-Type Cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2525–2533. doi:10.1128/AEM.04054-14
- O’Sullivan, D.J., Fallico, V., O’Sullivan, O., McSweeney, P.L.H., Sheehan, J.J., Cotter, P.D., Giblin, L., 2015b. High-throughput DNA sequencing to survey bacterial histidine and tyrosine decarboxylases in raw milk cheeses. *BMC Microbiol.* 15, 266. doi:10.1186/s12866-015-0596-0

P

- Pakkanen, R., Aalto, J., 1997. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. *Int. Dairy J.* 7, 285–297. doi:10.1016/S0958-6946(97)00022-8
- Palmquist, D.L., Denise Beaulieu, A., Barbano, D.M., 1993. Feed and Animal Factors Influencing Milk Fat Composition. *J. Dairy Sci.* 76, 1753–1771. doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77508-6
- Peet, R.K., 1974. The Measurement of Species Diversity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 5, 285–307.
- Petrone, G., Conte, M.P., Longhi, C., Di Santo, S., Superti, F., Ammendolia, M.G., Valenti, P., Seganti, L., 1998. Natural milk fatty acids affect survival and invasiveness of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 27, 362–368. doi:10.1046/j.1472-765X.1998.00441
- Pettersson, E., Lundeberg, J., Ahmadian, A., 2009. Generations of sequencing technologies. *Genomics* 93, 105–111. doi:10.1016/j.ygeno.2008.10.003
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. *Fungi and food spoilage*, New York: Springer. ed.
- Porcellato, D., Skeie, S.B., 2016. Bacterial dynamics and functional analysis of microbial metagenomes during ripening of Dutch-type cheese. *Int. Dairy J.* 61, 182–188. doi:10.1016/j.idairyj.2016.05.005
- Porcellato, D., Østlie, H.M., Brede, M.E., Martinovic, A., Skeie, S.B., 2013. Dynamics of starter, adjunct non-starter lactic acid bacteria and propionic acid bacteria in low-fat and full-fat Dutch-type cheese. *Int. Dairy J.*, 2012 IDF International Symposium on Cheese Ripening and Technology 33, 104–111. doi:10.1016/j.idairyj.2013.01.007
- Poznanski, S., Surazynski, A., d’Obyrn, T., Habaj, B., 1968. Activité de fermentation et de protéolyse de certaines souches de bactéries lactiques en présence d’acides gras. *Le Lait* 48, 261–274. doi:10.1051/lait:1968475-47614

Q

- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, 590–596. doi:10.1093/nar/gks1219

- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D., 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 664–698. doi:10.1111/1574-6976.12030
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5717–5723. doi:10.1128/AEM.00918-12
- 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. *Int. J. Food Microbiol.* 150, 81–94. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001

R

- 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 Microbiol.* 28, 465–471. doi:10.1016/j.fm.2010.10.009
- Ratomahenina, R., Chabalier, C., Galzy, P., 1994. Concerning *Sporendonema casei* Desmazieres. *Latte* 616–617.
- Ratnayake, 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, 891–909. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75308-7
- Riquelme, C., Câmara, S., Enes Dapkevicius, M. de L.N., Vinuesa, P., da Silva, C.C.G., Malcata, F.X., Rego, O.A., 2015. Characterization of the bacterial biodiversity in Pico cheese (an artisanal Azorean food). *Int. J. Food Microbiol.* 192, 86–94. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.031
- Rudi, K., Moen, B., Drømtorp, S.M., Holck, A.L., 2005. Use of Ethidium Monoazide and PCR in Combination for Quantification of Viable and Dead Cells in Complex Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1018–1024. doi:10.1128/AEM.71.2.1018-1024.2005

S

- Sattin, E., Andreani, N.A., Carraro, L., Fasolato, L., Balzan, S., Novelli, E., Squartini, A., Telatin, A., Simionati, B., Cardazzo, B., 2016. Microbial dynamics during shelf-life of industrial Ricotta cheese and identification of a *Bacillus* strain as a cause of a pink discolouration. *Food Microbiol.* 57, 8–15. doi:10.1016/j.fm.2015.12.009
- Schoch, C.L. et al. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 6241–6246. doi:10.1073/pnas.1117018109
- Shannon, C.E., 1948. A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.* 27, 379–423, 623–656.
- Shibasaki, I., Kato, N., 1978. Combined effects on antibacterial activity of fatty acids and their esters against Gram-negative bacteria, in: *The Pharmacological Effect of Lipids*. The American Oil Chemists Society.
- Sibra, C., Graulet, B., Cornu, A., Ferlay, A., Hurtaud, C., Martin, B., 2014. Les composés du lait et leur intérêt nutritionnel, in: *Composés D'intérêt Nutritionnel Du Lait et Des Fromages de Terroir*. pp. 117.
- Simpson, E.H., 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163, 688.
- Smit, G., Smit, B.A., Engels, W.J.M., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 591–610. doi:10.1016/j.fmrre.2005.04.002
- Steele, J., Broadbent, J., Kok, J., 2013. Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. *Curr. Opin. Biotechnol., Food biotechnology • Plant biotechnology* 24, 135–141. doi:10.1016/j.copbio.2012.12.001
- Stellato, G., De Filippis, F., La Storia, A., Ercolini, D., 2015. Coexistence of Lactic Acid Bacteria and Potential Spoilage Microbiota in a Dairy Processing Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7893–7904. doi:10.1128/AEM.02294-15
- Sun, Z., Liu, W., Bao, Q., Zhang, J., Hou, Q., Kwok, L., Sun, T., Zhang, H., 2014. Investigation of bacterial and fungal diversity in tarag using high-throughput sequencing. *J. Dairy Sci.* 97, 6085–6096. doi:10.3168/jds.2014-8360

T

- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Benno, Y., 2001. Diet-Dependent Shifts in the Bacterial Population of the Rumen Revealed with Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2766–2774. doi:10.1128/AEM.67.6.2766-2774.2001
- Tolle, A., 1980. The microflora of the udder. *Bull. Int. Dairy Fed.* 120, 4.
- Torbjørn Rognes, Tomáš Flouri, Ben Nichols, Christopher Quince, Frédéric Mahé, 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. doi:10.7287/peerj.preprints.2409v1

- Tornambé, G., Cornu, A., Verdier-Metz, I., Pradel, P., Kondjoyan, N., Figueredo, G., Hulin, S., Martin, B., 2008. Addition of Pasture Plant Essential Oil in Milk: Influence on Chemical and Sensory Properties of Milk and Cheese. *J. Dairy Sci.* 91, 58–69. doi:10.3168/jds.2007-0154
- Tornambé, G., Ferlay, A., Farruggia, A., Chilliard, Y., Loiseau, P., Garel, J.P., Martin, B., 2007. Effet de la diversité floristique des pâturages de montagne sur le profil en acides gras et les caractéristiques sensorielles des laits. *Rencontres Rech. Rumin.* 14, 333–336

U

- Urbach, G., 1990. Effect of Feed on Flavor in Dairy Foods. *J. Dairy Sci.* 73, 3639–3650. doi:10.3168/jds.S0022-0302(90)79067-4

V

- 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. *Int. J. Food Microbiol.* 146, 253–262. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.033
- Vallet, J., Laverroux, S., Chassaing, C., Girard, C.L., Agabriel, C., Martin, B., Graulet, B., 2013. Variations des teneurs en riboflavine du lait de vache selon les conditions de production. *Cah. Nutr. Diététique* 48, S57–S58. doi:10.1016/S0007-9960(13)70361-4
- Van Boekel, M.A.J.S., 1998. Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chem.* 62, 403–414. doi:10.1016/S0308-8146(98)00075-2
- van Hooijdonk, A.C.M., Kussendrager, K.D., Steijns, J.M., 2000. In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. *Br. J. Nutr.* 84, 127–134. doi:10.1017/S000711450000235X
- Verdier-Metz, I., Frélin, M., Delbès, C., Montel, M.C., 2015. Réservoirs du microbiote du lait cru et sa dynamique en fromage. XIV^{ème} Journée de l'animation transversale Glande mammaire, Lait. Paris.
- Verdier-Metz, I., Pradel, P., Monsallier, F., Montel, M.C., 2014. Effect of post-milking treatment on teat skin and milk microbial diversity of dairy cows. Forage resources and ecosystem services provided by Mountain and Mediterranean grasslands and rangelands, Options méditerranéennes, Clermont-Ferrand (France).
- Verdier-Metz, I., Gagne, G., Bornes, S., Monsallier, F., Veisseire, P., Delbès-Paus, C., Montel, M.-C., 2012a. Cow Teat Skin, a Potential Source of Diverse Microbial Populations for Cheese Production. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 326–333. doi:10.1128/AEM.06229-11
- Verdier-Metz, I., Monsallier, F., Montel, M.C., 2012b. Place des pâturages des bovins dans les flux microbiens laitiers. *Fourrages* 209, 53–58.
- Verdier-Metz, I., Michel, V., Delbès, C., Montel, M.-C., 2009. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiol.* 26, 305–310. doi:10.1016/j.fm.2008.12.005
- Verdier-Metz, I., Martin, B., Pradel, P., Albouy, H., Hulin, S., Montel, M.-C., Coulon, J.-B., 2005. Effect of grass-silage vs. hay diet on the characteristics of cheese: interactions with the cheese model. *Le Lait* 85, 12. doi:10.1051/lait:2005032
- Verdier-Metz, I., Martin, B., Hulin, S., Ferlay, A., Pradel, P., Coulon, J.B., 2002. Combined influence of cow diet and pasteurisation of the milk on sensory properties of French PDO Cantal cheese. Presented at the Congrilaït 26. World Dairy Congress, Paris, France.
- Verdier-Metz, I., Coulon, J.-B., Pradel, P., Viallon, C., Berdagué, J.-L., 1998. Effect of forage conservation (hay or silage) and cow breed on the coagulation properties of milks and on the characteristics of ripened cheeses. *J. Dairy Res.* 65, 9–21.
- Vilain, A.-C., 2010. Qu'est-ce que le lait ? *Rev. Fr. Allergol.*, 5^{ème} Congrès Francophone d'Allergologie 5rd Francophone Allergy Congress 50, 124–127. doi:10.1016/j.reval.2010.01.032

W

- Wang, L.L., Johnson, E.A., 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 624–629.
- Wilkinson, M.G., Kilcawley, K.N., 2005. Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *Int. Dairy J.*, The Fourth IDF Symposium on Cheese: Ripening, Characterization and Technology 15, 817–830. doi:10.1016/j.idairyj.2004.08.021
- 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

Wouters, J.T., Ayad, E.H., Hugenholtz, J., Smit, G., 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* 12, 91–109. doi:10.1016/S0958-6946(01)00151-0

y

Yvon, M., Rijnen, L., 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int. Dairy J., Cheese Ripening and Technology* 11, 185–201. doi:10.1016/S0958-6946(01)00049-8

z

Zdanowicz, M., Shelford, J.A., Tucker, C.B., Weary, D.M., von Keyserlingk, M.A.G., 2004. Bacterial Populations on Teat Ends of Dairy Cows Housed in Free Stalls and Bedded with Either Sand or Sawdust. *J. Dairy Sci.* 87, 1694–1701. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73322-6

Zhang, R., Huo, W., Zhu, W., Mao, S., 2015. Characterization of bacterial community of raw milk from dairy cows during subacute ruminal acidosis challenge by high-throughput sequencing. *J. Sci. Food Agric.* 95, 1072–1079. doi:10.1002/jsfa.6800

ANNEXES

Annexe 1: Supplementary Data related to the article *The effects of low-input grazing systems and milk pasteurisation on the chemical composition, microbial communities, and sensory properties of uncooked pressed cheeses*

Supplementary information A1

Details on fatty acids considered in sums reported in Tables 1 and 3.

- (2) $\sum$ other *cis*-C18:1: sum of *cis*11, 12, 13, 15 (co-elutes with C19:0), 16 (co-elutes with *cis*9*trans*12-C18:1) C18:1.
- (3) $\sum$ other *trans*-C18:1: sum of *trans*4, 5, 6/8, 9, 10, 12, 13 and 16 (co-elutes with *cis*14-C18:1) C18:1.
- (4) $\sum$ CLA: sum of ***cis*9*trans*11-CLA**, *cis*9*cis*11-CLA (co-elutes with C21:0), *trans*7*cis*9-CLA and *trans*8*cis*10-CLA.
In cheeses, the sum of CLA corresponded to the sum of ***cis*9*trans*11-CLA** (co-elutes with *trans*7*cis*9-CLA), *cis*9*cis*11-CLA, *trans*9*trans*11-CLA and *trans*11*trans*13-CLA (Table 4).
- (5) $\sum$ *n*-3 LCPUFA: sum of **C18:3*n*-3**, C20:5*n*-3, C22:5*n*-3, C22:6*n*-3.
- (6) $\sum$ *n*-6 LCPUFA: sum of **C18:2*n*-6**, C18:3*n*-6, C20:2*n*-6, C20:3*n*-6, C20:4*n*-6.
- (7) $\sum$ SFA: sum of C4:0, C5:0, C6:0, C7:0, C8:0, C9:0, C10:0, C11:0, C12:0, *iso*-C13:0, *anteiso*-C13:0, C14:0, *iso*-C14:0, C15:0, *anteiso*-C15:0, C16:0, *iso*-C16:0, C17:0, *anteiso*-C17:0, C18:0, *iso*-C18:0, C20:0, C22:0, C23:0, C24:0.
In cheeses, it must be added C21 to sum of SFA (Table 4).
- (8) $\sum$ *cis*-MUFA: sum of *cis*9-C10:1, *cis*9-C12:1 (co-elutes with C13:0), *cis*9-C14:1, *cis*9-C16:1, *cis*11-C16:1, *cis*9-C17:1, *cis*9, 11, 12, 13, 15 (co-elutes with C19:0), 16 (co-elutes with *cis*9*trans*12-C18:2) C18:1, *cis*7-C19:1, *cis*9-C20:1, *cis*11-C20:1, *cis*13-C22:1 (co-elutes with C20:3*n*-3).
- (9) $\sum$ *trans*-MUFA: sum of *trans*9-C14:1, *trans*6,8-C16:1, *trans*9-C16:1 (co-elutes with *iso*-C17:0), *trans*11-C16:1, *trans*4, 5, 6/8, 9, 10, 11, 12, 13, 16 C18:1.
In cheeses, *trans*6-C18:1 co-elutes with *cis*14-C18:1 (Table 4).
- (10) $\sum$ PUFA: sum of *cis*9*trans*13, *cis*9*trans*14 (co-elutes with *cis*9*trans*12-C18:2), *trans*11*cis*15 C18:2, *cis*9*trans*11 (contains *trans*7*cis*9-CLA and *trans*8*cis*10-CLA as minor components), *cis*9*cis*11 (co-elutes with C21:0), *trans*9*trans*11, *trans*11*trans*13 CLA, C18:2*n*-6, C18:3*n*-6, C18:3*n*-3, C20:2*n*-6, C20:3*n*-6, C20:5*n*-3, C22:5*n*-3, C22:6*n*-3.

S1 Table. Average animal and grassland characteristics and grass nutrient composition in the extensive (EXT) and semi-intensive (SEMI) production systems

Item	July		September	
	EXT	SEMI	EXT	SEMI
Animal Characteristics¹				
Number of primiparous Holstein cows	4	3	4	3
Number of multiparous Holstein cows	4	6	4	6
Number of primiparous Montbeliarde cows	4	3	4	3
Number of multiparous Montbeliarde cows	3	5	3	5
Day in Milk (d)	52 (± 23)	50 (± 21)	116 (± 23)	113 (± 21)
Milk yield (kg day ⁻¹ cow)	19.2 (± 4.1)	22.1 (± 5.3)	12.5 (± 2.4)	19.3 (± 3.6)
Animal Weight (kg)	589 (± 41)	582 (± 91)	583 (± 35)	605 (± 84)
Body Condition Score (/5)	1.58 (± 0.47)	1.49 (± 0.33)	1.20 (± 0.32)	1.45 (± 0.29)
Paddock Characteristics				
Total species (number)	86	38	86	34
Grasses (number and %)	21 (49.8%)	12 (75.1%)	21 (49.8%)	16 (56.0%)
Legumes (number and %)	8 (15.5%)	3 (4.4%)	8 (15.5%)	2 (6.5%)
Dicotyledons(number and %)	57 (34.6%)	23 (20.6%)	57 (34.6%)	16 (37.5%)
Date of entrance	29/06	1/07	1/09	4/09
Grass height at the entrance of cows (cm)	13.1 (± 4.4)	11.8 (± 3.0)	9.1 (± 4.6)	10.9 (± 2.7)
Grass height at the exit of cows (cm)	10.8 (± 4.6)	6.7 (± 2.0)	7.8 (± 3.4)	7.9 (± 2.4)
Herbage Mass at the entrance (tDM ha ⁻¹) ²	2.02	2.05	1.94	1.36
Dry matter (%)	28.0	22.0	27.0	27.0
Crude Protein (% DM)	1.99	3.03	1.55	2.33
NDF (% DM)	61.6	51.6	60.7	55.5
ADF (% DM)	31.5	25.0	32.0	27.1
Digestibility (%) ³	54.5	71.4	48.6	66.8

Abbreviations are: EXT = extensive grazing system; SEMI = semi-intensive grazing system; DM = dry matter; NDF= neutral detergent fiber; ADF=Acid detergent fiber.

¹Average data from the July 2-15 and from September 3-16

²Herbage mass was performed in the experimental plots the day of the paddock change. Four to ten 0.25-m² quadrats for SEMI and EXT plot respectively were cut below 4–5 cm and weighted.

³Pepsin-cellulase digestibility of organic matter (Aufrère et al. 2007. *INRA Production Animal*, 20, 129-136)

S2 Table. Effects of grazing system and period of cheese-making on concentrations of fatty acids in milks

FA (g 100 g ⁻¹ of FA)	July		September		SEM	Effects and significance		
	EXT	SEMI	EXT	SEMI		S	P	S*P
C4:0	3.29	3.02	3.17	3.10	0.045	•	ns	ns
C5:0	0.02	0.03	0.02	0.02	0.002	**	ns	ns
C6:0	1.92	2.15	1.86	2.03	0.046	*	ns	ns
C7:0	0.01	0.03	0.01	0.02	0.003	**	ns	•
C8:0	0.97	1.31	0.95	1.15	0.051	**	ns	ns
C9:0	0.01	0.04	0.01	0.02	0.004	**	ns	ns
C10:0	1.82	2.88	1.84	2.47	0.155	**	ns	ns
cis9-C10:1	0.19	0.30	0.23	0.33	0.019	***	ns	ns
C11:0	0.02	0.07	0.03	0.05	0.007	**	ns	ns
C12:0	2.19	3.58	2.32	3.22	0.203	**	ns	ns
iso-C13:0	0.05	0.05	0.06	0.06	0.002	ns	**	ns
anteiso-C13:0	0.02	0.01	0.02	0.02	0.001	ns	•	ns
C13:0+ cis9-C12:1	0.11	0.21	0.14	0.20	0.015	**	ns	ns
iso-C14:0	0.16	0.14	0.21	0.17	0.009	*	**	ns
C14:0	8.71	11.15	9.44	11.49	0.388	***	ns	ns
iso-C15:0	0.36	0.31	0.50	0.38	0.022	**	***	ns
trans9-C14:1	0.01	0.01	0.01	0.02	0.001	•	**	ns
anteiso-C15:0	0.58	0.65	0.71	0.71	0.019	ns	**	ns
cis9-C14:1	0.58	0.92	0.76	1.26	0.078	***	***	ns
C15:0	1.09	1.25	1.40	1.25	0.037	ns	**	**
iso-C16:0	0.38	0.33	0.45	0.37	0.015	**	**	ns
trans6,8-C16:1	0.02	0.03	0.03	0.02	0.001	ns	ns	***
trans9-C16:1+iso-C17:0	0.68	0.65	0.69	0.79	0.023	ns	•	•
trans11-C16:1	0.29	0.27	0.28	0.22	0.008	***	***	***
anteiso-C17:0	0.52	0.48	0.50	0.45	0.013	•	ns	ns
cis9-C16:1	1.41	1.39	1.43	1.59	0.027	•	**	*
cis11-C16:1	0.03	0.03	0.03	0.02	0.001	ns	**	ns
C17:0	0.85	0.75	0.87	0.66	0.029	**	ns	•
iso-C18:0	0.10	0.07	0.08	0.05	0.006	***	*	ns
cis9-C17:1	0.38	0.29	0.34	0.22	0.020	**	*	ns
trans4-C18:1	0.01	0.02	0.01	0.01	0.001	**	*	ns
trans5-C18:1	0.01	0.02	0.01	0.01	0.001	**	ns	*
trans6,8-C18:1	0.19	0.20	0.16	0.20	0.007	•	ns	ns
trans9-C18:1	0.20	0.20	0.18	0.21	0.004	•	ns	•
trans10-C18:1	0.17	0.29	0.18	0.28	0.022	*	ns	ns
trans11-C18:1	2.60	3.25	2.33	3.82	0.215	**	ns	ns
trans12-C18:1	0.22	0.29	0.20	0.26	0.014	*	ns	ns
trans13-C18:1	0.37	0.46	0.37	0.39	0.019	ns	ns	ns
cis11-C18:1	0.75	0.60	0.63	0.50	0.031	**	*	ns
cis12-C18:1	0.09	0.11	0.09	0.08	0.006	ns	ns	ns
cis13-C18:1	0.08	0.09	0.06	0.06	0.005	ns	**	ns

trans16-C18:1+cis14-C18:1	0.29	0.32	0.34	0.24	0.014	ns	ns	*
cis15-C18:1+C19	0.18	0.20	0.22	0.16	0.008	ns	ns	*
trans9trans13-C18:2	0.16	0.22	0.17	0.19	0.010	*	ns	ns
cis9trans14-C18:2 (+cis9trans12-C18:2)	0.09	0.09	0.10	0.08	0.004	ns	ns	ns
cis16-C18:1 (+cis9trans12-C18:1)	0.06	0.07	0.06	0.05	0.004	ns	ns	ns
cis7-C19:1	0.04	0.04	0.03	0.03	0.004	ns	ns	ns
trans11cis15-C18:2	0.26	0.26	0.30	0.29	0.017	ns	ns	ns
C18:2 n-6	1.30	1.33	1.22	1.03	0.038	•	***	*
C20:0	0.17	0.10	0.20	0.10	0.015	***	ns	ns
C18:3 n-6	0.02	0.02	0.02	0.02	0.001	ns	ns	ns
cis9-C20:1	0.11	0.08	0.15	0.09	0.009	**	*	ns
cis11-C20:1	0.05	0.04	0.03	0.02	0.003	*	**	ns
cis9trans11-CLA (+trans7cis9-CLA)	0.97	1.34	1.00	2.13	0.153	***	*	*
C21:0+cis9cis11-CLA	0.09	0.07	0.09	0.08	0.004	*	ns	ns
trans11trans13-CLA	0.02	0.03	0.02	0.02	0.001	ns	ns	ns
trans9trans11-CLA	0.02	0.02	0.02	0.02	0.001	ns	ns	ns
C20:2 n-6	0.03	0.04	0.04	0.04	0.002	ns	ns	ns
C22:0	0.08	0.04	0.10	0.04	0.008	***	ns	•
C20:3 n-6	0.03	0.04	0.04	0.04	0.002	*	**	*
cis13-C22:1+C20:3 n-3	0.02	0.02	0.02	0.02	0.001	ns	ns	ns
C20:4 n-6	0.07	0.07	0.07	0.07	0.001	ns	ns	ns
C23:0	0.04	0.03	0.05	0.02	0.003	***	ns	**
C20:5 n-3	0.06	0.06	0.09	0.07	0.004	*	**	*
C24:0	0.05	0.04	0.06	0.03	0.004	**	ns	ns
C24:1 n-9	0.01	0.01	0.01	0.01	0.001	ns	ns	ns
C22:5 n-3	0.16	0.15	0.20	0.17	0.006	*	*	ns
C22:6 n-3	0.02	0.01	0.01	0.01	0.001	*	•	ns
Σ non identified	0.75	0.78	0.93	0.87	0.021	ns	***	*

Values reported are the mean from triplicate milk samples (n=3).

Abbreviations are: EXT = extensive grazing system; SEMI = semi-intensive grazing system; S = grazing system; P = period; FA = fatty acids; CLA = conjugated linoleic acid; SEM = standard error of the mean.

• $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = not significant

S3 Table. Effects of grazing system, period of cheese-making and treatment of milk on pH and dry matter recorded during Cantal cheese-making¹

Parameter	Raw				Pasteurised				SEM	Effects and significance			
	July		September		July		September			S	P	T	S*P
	EXT	SEMI	EXT	SEMI	EXT	SEMI	EXT	SEMI					
Rennet clotting time (min)	19.0	21.0	17.0	20.7	19.0	21.0	16.3	20.3	0.428	***	*	ns	ns
pH pressed curd	6.60	6.61	6.63	6.63	6.60	6.60	6.63	6.63	0.004	ns	***	ns	ns
pH pounded curd	5.16	5.18	5.20	5.18	5.20	5.21	5.19	5.21	0.005	ns	ns	•	ns
pH curd at placing in cellar	5.21	5.23	5.22	5.21	5.21	5.23	5.21	5.24	0.005	ns	ns	ns	ns
DM pressed curd (%)	54.6	54.3	52.0	51.5	54.3	53.2	51.2	51.3	0.305	ns	***	*	ns
DM pounded curd (%)	56.7 ^a	54.8 ^b	53.7 ^c	53.3 ^c	55.5 ^b	54.9 ^b	53.2 ^c	53.8 ^c	0.252	*	***	ns	**
DM moulded curd (%)	57.2	56.3	54.6	54.3	56.3	55.4	53.0	54.0	0.255	*	***	*	ns
DM placed in cellar (%)	61.1	60.4	61.4	60.3	60.8	59.9	60.3	59.5	0.145	***	ns	**	ns
Cheese yield (%)	8.8 ^{bc}	8.3 ^{de}	9.0 ^{ab}	9.3 ^a	8.4 ^{cd}	7.9 ^e	8.5 ^{cd}	9.0 ^{ab}	0.099	ns	***	**	***

Values reported are the mean from triplicate milk cheese-makings (n=3).

¹Abbreviations are: EXT = extensive grazing system; SEMI = semi-intensive grazing system; S = grazing system; P = period; DM = dry matter; SEM = standard error of the means. The non-significant interactions (S*T and P*T) were not reported in the table.

^{a-c} Values with different superscript letters differ at $P < 0.05$ by statistical Benjamini-Hochberg test.

• $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = not significant

S4 Table. Effects of grazing system, period of cheese-making and treatment of milk on concentrations of fatty acids in cheese cores

FA (g 100 g ⁻¹ of FA)	Raw				Pasteurised				SEM	Effects and significance			
	July		September		July		September			S	P	T	S*P
	EXT	SEMI	EXT	SEMI	EXT	SEMI	EXT	SEMI					
C4:0	3.77	3.42	3.35	3.56	3.68	3.60	3.32	3.41	0.051	ns	*	ns	•
C5:0	0.01	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.01	0.02	0.001	***	ns	ns	ns
C6:0	1.94	2.09	1.75	2.07	1.90	2.17	1.77	1.99	0.037	***	*	ns	ns
C7:0	0.01	0.03	0.01	0.02	0.01	0.03	0.01	0.02	0.002	***	ns	ns	ns
C8:0	0.99	1.26	0.91	1.20	0.98	1.31	0.93	1.15	0.035	***	•	ns	ns
C9:0	0.01	0.04	0.01	0.03	0.01	0.04	0.01	0.02	0.003	***	ns	ns	ns
C10:0	1.98	3.00	1.94	2.74	1.97	3.06	1.98	2.64	0.110	***	ns	ns	ns
cis9-C10:1	0.19	0.30	0.23	0.36	0.19	0.31	0.24	0.34	0.014	***	**	ns	ns
C11:0	0.02	0.07	0.02	0.05	0.02	0.07	0.03	0.05	0.005	***	ns	ns	.
C12:0	2.24	3.57	2.35	3.33	2.23	3.59	2.38	3.25	0.138	***	ns	ns	ns
iso-C13:0	0.05	0.05	0.06	0.06	0.05	0.05	0.06	0.06	0.001	•	***	ns	ns
anteiso-C13:0	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.000	ns	ns	ns	ns
C13:0+ cis9-C12:1	0.11	0.21	0.14	0.20	0.11	0.22	0.14	0.20	0.010	***	ns	ns	•
iso-C14:0	0.16	0.13	0.21	0.17	0.16	0.13	0.21	0.17	0.006	**	***	ns	ns
C14:0	8.68	11.09	9.40	11.6	8.73	10.9	9.46	11.50	0.262	***	*	ns	ns
iso-C15:0	0.36	0.32	0.49	0.39	0.36	0.31	0.49	0.38	0.015	***	***	ns	•
trans9-C14:1	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.001	***	***	ns	ns
anteiso-C15:0	0.58	0.65	0.71	0.71	0.58	0.63	0.70	0.71	0.013	•	***	ns	•
cis9-C14:1	0.58	0.91	0.76	1.26	0.58	0.90	0.78	1.26	0.053	***	***	ns	*
C15:0	1.08	1.25	1.40	1.25	1.08	1.22	1.38	1.25	0.025	ns	***	ns	***
iso-C16:0	0.37	0.33	0.44	0.36	0.37	0.33	0.44	0.36	0.010	***	***	ns	ns
trans6,8-C16:1	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.001	*	ns	ns	ns
trans9-C16:1 +iso-C17:0	0.68	0.64	0.69	0.79	0.68	0.64	0.70	0.79	0.015	ns	**	ns	*
trans11-C16:1	0.28	0.28	0.29	0.23	0.28	0.28	0.28	0.22	0.006	***	***	ns	***
anteiso-C17:0	0.53	0.49	0.52	0.44	0.54	0.49	0.51	0.45	0.010	**	•	ns	ns
cis9-C16:1	1.38	1.37	1.43	1.58	1.41	1.36	1.43	1.63	0.022	**	***	ns	***
cis11-C16:1	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.001	ns	***	ns	ns
C17:0	0.85	0.75	0.87	0.65	0.84	0.74	0.86	0.65	0.020	***	ns	ns	*
iso-C18:0	0.11	0.07	0.09	0.06	0.11	0.07	0.09	0.06	0.004	***	***	ns	ns
cis9-C17:1	0.37	0.29	0.35	0.23	0.38	0.28	0.34	0.23	0.013	***	**	ns	ns
trans4-C18:1	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.001	ns	ns	ns	ns
trans5-C18:1	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.001	*	ns	ns	ns
trans6,8-C18:1	0.17	0.21	0.17	0.20	0.16	0.19	0.17	0.21	0.005	***	ns	ns	ns
trans9-C18:1	0.18	0.17	0.20	0.22	0.19	0.21	0.19	0.22	0.005	*	*	ns	ns
trans10-C18:1	0.15	0.23	0.16	0.25	0.14	0.19	0.16	0.22	0.011	**	ns	ns	ns
trans11-C18:1	2.61	3.34	2.37	3.82	2.62	3.33	2.45	3.85	0.149	***	ns	ns	ns
trans12-C18:1	0.19	0.29	0.21	0.26	0.18	0.28	0.19	0.27	0.011	***	ns	ns	ns
trans13-C18:1	0.32	0.35	0.31	0.32	0.27	0.40	0.35	0.34	0.015	ns	ns	ns	ns
cis11-C18:1	0.74	0.61	0.61	0.51	0.74	0.61	0.62	0.51	0.020	***	*	ns	ns
cis12-C18:1	0.09	0.11	0.09	0.10	0.09	0.10	0.09	0.09	0.002	***	***	ns	ns

cis13-C18:1	0.09	0.10	0.07	0.06	0.09	0.08	0.07	0.07	0.003	*	ns	ns	ns
trans16-C18:1 +cis14-C18:1	0.31	0.32	0.34	0.24	0.31	0.31	0.34	0.25	0.009	ns	***	ns	ns
cis15-C18:1+C19	0.20	0.21	0.22	0.16	0.20	0.21	0.22	0.16	0.005	**	ns	ns	***
trans9trans13-C18:2	0.16	0.22	0.18	0.19	0.16	0.23	0.18	0.19	0.007	**	ns	ns	*
cis9trans14-C18:2 (+cis9trans12-C18:2)	0.09	0.11	0.11	0.08	0.09	0.11	0.10	0.08	0.004	ns	ns	ns	**
cis16-C18:1 (+cis9trans12-C18:1)	0.07	0.06	0.06	0.05	0.06	0.08	0.07	0.05	0.002	•	**	ns	*
cis7-C19:1	0.05	0.06	0.03	0.04	0.04	0.06	0.04	0.04	0.003	ns	*	ns	ns
trans11cis15-C18:2	0.27	0.28	0.31	0.29	0.27	0.29	0.32	0.30	0.011	ns	ns	ns	ns
C18:2 n-6	1.31	1.34	1.25	1.01	1.33	1.36	1.27	1.04	0.029	**	***	ns	***
C20:0	0.18	0.12	0.23	0.10	0.18	0.11	0.22	0.10	0.011	***	ns	ns	*
C18:3 n-6	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.001	ns	ns	ns	ns
cis9-C20:1	0.12	0.09	0.16	0.11	0.12	0.09	0.16	0.10	0.006	***	**	ns	*
cis11-C20:1	0.05	0.04	0.04	0.01	0.04	0.04	0.04	0.02	0.003	**	***	ns	*
cis9trans11-CLA (+trans7cis9-CLA)	0.96	1.35	1.01	2.03	0.96	1.35	1.08	2.07	0.097	***	***	ns	**
C21:0	0.03	0.02	0.04	0.02	0.03	0.02	0.04	0.03	0.002	•	ns	ns	ns
cis9cis11-CLA	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.03	0.05	0.07	0.003	ns	*	ns	ns
trans11trans13-CLA	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.001	ns	ns	ns	ns
trans9trans11-CLA	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.05	0.002	*	**	ns	ns
C20:2 n-6	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03	0.001	ns	•	ns	*
C22:0	0.07	0.05	0.10	0.04	0.08	0.04	0.10	0.04	0.005	***	•	ns	**
C20:3 n-6	0.03	0.04	0.05	0.04	0.03	0.04	0.05	0.05	0.001	ns	**	ns	*
cis13-C22:1 +C20:3 n-3	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.001	***	ns	ns	***
C20:4 n-6	0.07	0.08	0.07	0.07	0.07	0.08	0.07	0.07	0.001	ns	*	ns	*
C23:0	0.04	0.03	0.05	0.03	0.04	0.03	0.05	0.03	0.002	***	•	ns	**
C20:5 n-3	0.07	0.07	0.09	0.06	0.07	0.08	0.10	0.07	0.002	***	*	ns	***
C24:0	0.05	0.04	0.06	0.03	0.05	0.03	0.06	0.03	0.003	***	ns	ns	*
C24:1 n-9	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.001	ns	ns	ns	ns
C22:5 n-3	0.18	0.16	0.21	0.16	0.17	0.16	0.21	0.17	0.005	***	*	ns	*
C22:6 n-3	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.001	ns	*	ns	•
Σ non identified	0.83	0.85	1.07	0.97	0.82	0.88	0.98	0.91	0.019	ns	***	ns	*

Values reported are the mean from triplicate cheese samples (n=3).

Abbreviations are: EXT = extensive grazing system; SEMI = semi-intensive grazing system; S = grazing system; T = treatment of milk; P = period; FA = fatty acids; CLA = conjugated linoleic acid; SEM = standard error of the means. The non-significant interactions (P*T and S*T) were not reported in the table.

• $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = not significant

S5 Table. Effects of grazing system, period of cheese-making and treatment of milk on concentrations of fatty acids in cheese rind

FA (g 100 g ⁻¹ of FA)	Raw				Pasteurised				SEM	Effects and significance			
	July		September		July		September			S	P	T	S*P
	EXT	SEMI	EXT	SEMI	EXT	SEMI	EXT	SEMI					
C4:0	3.16	3.31	2.91	3.16	3.14	2.86	2.82	2.76	0.185	ns	*	**	ns
C5:0	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.001	***	ns	ns	ns
C6:0	1.67	2.05	1.61	1.87	1.67	1.78	1.55	1.69	0.037	***	*	*	ns
C7:0	0.01	0.03	0.01	0.02	0.01	0.03	0.01	0.02	0.002	***	•	ns	*
C8:0	0.85	1.22	0.84	1.08	0.87	1.09	0.84	1.01	0.032	***	•	ns	ns
C9:0	0.01	0.04	0.01	0.02	0.01	0.03	0.01	0.02	0.002	***	*	ns	*
C10:0	1.78	2.96	1.83	2.55	1.83	2.74	1.86	2.46	0.106	***	ns	ns	ns
cis9-C10:1	0.17	0.29	0.21	0.32	0.18	0.27	0.21	0.30	0.012	***	**	ns	ns
C11:0	0.02	0.07	0.03	0.05	0.02	0.06	0.03	0.04	0.004	***	ns	ns	•
C12:0	2.07	3.56	2.26	3.21	2.12	3.39	2.28	3.18	0.138	***	ns	ns	ns
iso-C13:0	0.04	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.001	ns	***	ns	ns
anteiso-C13:0	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.001	ns	•	ns	ns
C13:0+ cis9-C12:1	0.10	0.21	0.13	0.19	0.10	0.20	0.13	0.19	0.010	***	ns	ns	•
iso-C14:0	0.15	0.13	0.20	0.17	0.14	0.13	0.19	0.16	0.006	**	***	ns	ns
C14:0	8.84	11.44	9.69	11.70	8.72	11.17	9.59	11.71	0.270	***	*	ns	ns
iso-C15:0	0.36	0.32	0.50	0.38	0.36	0.32	0.49	0.39	0.015	***	***	ns	*
trans9-C14:1	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.001	*	*	ns	ns
anteiso-C15:0	0.57	0.65	0.69	0.70	0.56	0.64	0.67	0.68	0.013	*	***	ns	*
cis9-C14:1	0.51	0.82	0.70	1.17	0.52	0.78	0.68	1.09	0.048	***	***	ns	**
C15:0	1.14	1.30	1.47	1.28	1.12	1.29	1.44	1.29	0.026	ns	***	ns	***
iso-C16:0	0.38	0.33	0.46	0.37	0.39	0.34	0.45	0.37	0.010	***	***	ns	ns
trans6,8-C16:1	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.001	ns	ns	ns	ns
trans9-C16:1 +iso-C17:0	0.71	0.66	0.72	0.81	0.70	0.67	0.72	0.82	0.016	ns	**	ns	*
trans11-C16:1	0.28	0.25	0.28	0.22	0.28	0.26	0.27	0.22	0.005	***	***	ns	***
anteiso-C17:0	0.55	0.50	0.53	0.46	0.55	0.51	0.53	0.47	0.010	**	ns	ns	ns
cis9-C16:1	1.27	1.27	1.33	1.49	1.26	1.23	1.27	1.43	0.022	*	***	ns	**
cis11-C16:1	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.02	0.001	*	*	ns	ns
C17:0	0.93	0.80	0.94	0.68	0.92	0.81	0.92	0.70	0.023	***	*	ns	*
iso-C18:0	0.12	0.08	0.09	0.06	0.11	0.08	0.09	0.06	0.004	***	***	ns	ns
cis9-C17:1	0.34	0.24	0.32	0.21	0.34	0.27	0.31	0.22	0.011	***	*	ns	ns
trans4-C18:1	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.001	ns	ns	ns	ns
trans5-C18:1	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.001	**	•	**	**
trans6,8-C18:1	0.15	0.20	0.17	0.19	0.15	0.18	0.17	0.19	0.004	***	ns	ns	ns
trans9-C18:1	0.19	0.20	0.17	0.20	0.18	0.20	0.18	0.21	0.003	***	ns	ns	ns
trans10-C18:1	0.14	0.26	0.14	0.19	0.16	0.26	0.14	0.22	0.012	***	*	ns	•
trans11-C18:1	2.63	3.25	2.39	3.91	2.59	3.26	2.46	3.85	0.454	***	ns	ns	*
trans12-C18:1	0.21	0.29	0.20	0.25	0.20	0.29	0.22	0.26	0.010	***	ns	ns	ns
trans13-C18:1	0.35	0.49	0.35	0.36	0.34	0.44	0.34	0.35	0.016	*	•	ns	•
cis11-C18:1	0.69	0.57	0.60	0.50	0.67	0.56	0.59	0.49	0.016	***	•	ns	ns
cis12-C18:1	0.09	0.11	0.10	0.09	0.08	0.11	0.10	0.09	0.003	***	***	ns	ns

cis13-C18:1	0.08	0.09	0.06	0.06	0.10	0.09	0.06	0.06	0.004	ns	ns	ns	**
trans16-C18:1 +cis14-C18:1	0.33	0.32	0.36	0.26	0.34	0.34	0.36	0.27	0.009	ns	**	ns	ns
cis15-C18:1+C19	0.20	0.19	0.22	0.17	0.20	0.21	0.22	0.17	0.005	**	ns	ns	**
trans9trans13-C18:2	0.14	0.18	0.16	0.19	0.15	0.20	0.16	0.18	0.006	**	ns	ns	ns
cis9trans14-C18:2 (+cis9trans12-C18:2)	0.08	0.08	0.09	0.07	0.08	0.09	0.09	0.10	0.003	ns	ns	•	ns
cis16-C18:1 (+cis9trans12-C18:1)	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06	0.07	0.07	0.06	0.002	ns	ns	ns	ns
cis7-C19:1	0.04	0.04	0.03	0.04	0.03	0.05	0.04	0.06	0.004	•	ns	ns	ns
trans11cis15-C18:2	0.26	0.22	0.29	0.29	0.23	0.27	0.30	0.30	0.012	ns	•	ns	ns
C18:2 n-6	1.43	1.44	1.35	1.09	1.85	1.93	1.67	1.54	0.056	•	***	***	**
C20:0	0.21	0.11	0.24	0.11	0.21	0.13	0.24	0.11	0.012	***	ns	ns	*
C18:3 n-6	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.001	ns	ns	ns	•
cis9-C20:1	0.11	0.08	0.14	0.09	0.10	0.07	0.13	0.09	0.005	***	**	ns	ns
cis11-C20:1	0.04	0.03	0.03	0.01	0.04	0.04	0.03	0.02	0.003	*	***	ns	ns
C18:3 n-3	0.79	0.66	0.83	0.61	0.77	0.70	0.83	0.61	0.020	***	ns	ns	**
cis9trans11-CLA (+trans7cis9-CLA)	0.82	1.11	0.87	1.88	0.82	1.15	0.93	1.84	0.092	***	***	ns	**
C21:0	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.05	0.02	0.002	***	ns	ns	*
cis9cis11-CLA	0.05	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.002	ns	ns	ns	ns
trans11trans13-CLA	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.002	ns	ns	ns	ns
trans9trans11-CLA	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.05	0.06	0.04	0.003	ns	ns	*	ns
C20:2 n-6	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.002	ns	ns	ns	ns
C22:0	0.09	0.05	0.11	0.04	0.08	0.05	0.11	0.05	0.006	***	*	ns	***
C20:3 n-6	0.03	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.001	**	*	ns	•
cis13-C22:1 +C20:3 n-3	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.001	•	•	ns	**
C20:4 n-6	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.07	0.06	0.06	0.001	ns	*	ns	ns
C23:0	0.05	0.03	0.06	0.02	0.04	0.03	0.06	0.03	0.003	***	ns	ns	*
C20:5 n-3	0.07	0.06	0.08	0.06	0.07	0.06	0.08	0.06	0.002	***	**	•	**
C24:0	0.06	0.04	0.07	0.03	0.06	0.04	0.07	0.04	0.004	***	ns	ns	•
C24:1 n-9	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.001	ns	ns	ns	ns
C22:5 n-3	0.16	0.13	0.20	0.16	0.16	0.14	0.18	0.15	0.005	***	***	ns	ns
C22:6 n-3	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.001	*	ns	ns	**
Σ non identified	0.78	0.76	0.94	0.88	0.77	0.78	0.91	0.86	0.015	•	***	ns	•

Values reported are the mean from triplicate cheese samples (n=3).

Abbreviations are: EXT = extensive grazing system; SEMI = semi-intensive grazing system; S = grazing system; T = treatment of milk; P = period; FA = fatty acids; CLA = conjugated linoleic acid; SEM = standard error of the means. The non-significant interactions (P*T and S*T) were not reported in the table.

• $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = not significant

Annexe 2: Supplementary Data related to the article **Bacterial community assembly from cow teat skin to ripened cheeses according to the grazing systems**

Table S1. Summary of the characteristics of the 16S rRNA genes metabarcoding data, number of total tags sequenced by period and grazing system, the observed richness, and richness estimators

Sample	Period	System ¹	Identification of replicate	No. sequenced tags	No. of observed OTUs	Chao1	Simpson	Shannon
Teat skin	July	EXT	T1	27853	276	287.55	0.96	4.08
			T2	36072	256	274.40	0.93	3.63
			T3	27551	273	293.62	0.92	3.58
		SEMI	T4	29451	268	280.06	0.94	3.72
			T5	31196	259	276.33	0.93	3.53
			T6	22106	237	258.65	0.90	3.17
	September	EXT	T7	27373	274	289.00	0.95	3.97
			T8	29720	268	281.23	0.94	3.86
			T9	23685	253	281.50	0.96	3.86
		SEMI	T10	49632	281	290.67	0.95	4.00
			T11	27572	233	267.23	0.81	2.82
			T12	10006	255	266.72	0.97	4.16
Raw milk	July	EXT	M1	1947	31	40.43	0.65	1.69
			M2	7132	63	95.09	0.92	2.91
			M3	583	31	39.00	0.84	2.34
		SEMI	M4	5205	33	34.00	0.51	1.19
			M5	3081	29	36.33	0.73	1.82
			M6	885	25	34.50	0.91	2.70
	September	EXT	M7	4997	31	46.00	0.74	1.98
			M8	5427	63	78.43	0.85	2.61
			M9	4450	69	89.25	0.84	2.72
		SEMI	M10	1425	52	72.00	0.90	2.80
			M11	1991	37	66.75	0.87	2.47
			M12	4540	70	131.17	0.86	2.73
Cheese core	July	EXT	C1	39135	37	44.00	0.04	0.17
			C2	67054	39	50.67	0.06	0.22
			C3	54392	40	53.00	0.10	0.32
		SEMI	C4	33136	37	41.75	0.04	0.16
			C5	55330	40	74.50	0.05	0.19
			C6	39314	38	45.67	0.05	0.18
	September	EXT	C7	30092	35	48.50	0.04	0.15
			C8	44530	37	45.50	0.05	0.19
			C9	37012	38	76.20	0.03	0.13
		SEMI	C10	75676	36	50.25	0.05	0.18
			C11	35550	34	54.15	0.07	0.25
			C12	84420	35	59.25	0.05	0.20
Cheese rind	July	EXT	R1	45832	70	81.63	0.53	1.42
			R2	44498	68	82.00	0.32	0.91
			R3	41084	68	78.50	0.52	1.29
		SEMI	R4	47620	72	78.00	0.51	1.34
			R5	34228	72	85.88	0.28	0.85
			R6	58473	69	77.20	0.65	1.59
	September	EXT	R7	26974	63	79.80	0.67	1.59
			R8	72704	68	82.00	0.18	0.58
			R9	36984	69	106.06	0.56	1.35
		SEMI	R10	130736	72	89.50	0.48	1.23
			R11	38485	63	73.00	0.54	1.20
			R12	79325	73	89.00	0.37	1.01

¹ EXT= extensive grazing system; SEMI = semi-intensive grazing system

Table S2. Taxonomic distribution of isolates obtained from raw milk

Phylum	Genus and/or species ¹	July		September	
		EXT ²	SEMI ³	EXT ²	SEMI ³
<i>Actinobacteria</i> (32.7%)	<i>Bifidobacterium crudilactis</i>	2	1	1	
	<i>Gordonia sputi</i>				1
	<i>Rhodococcus coprophilus</i>				1
	<i>Salana sp.</i>	1			
	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	1		1	1
	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>		1	1	1
	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>				1
	<i>Leifsonia aquatica</i>			1	
	<i>Microbacterium aurum</i>		1		
	<i>Microbacterium flavum</i>	1		1	
	<i>Microbacterium lacticum</i>		2		2
	<i>Microbacterium oxydans</i>	5	2	2	1
	<i>Microbacterium sp.</i>				1
	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i>			2	
	<i>Kocuria carniphila</i>	1	1		
	<i>Kocuria palustris</i>			2	1
	<i>Kocuria rhizophila</i>	1			
	<i>Kocuria salsicia</i>	9	8	5	3
	<i>Propionocyclava sp.</i>	3	5	4	4
	Total for phylum	24	21	20	17
<i>Bacteroidetes</i> (5.2%)	<i>Chryseobacterium bovis</i>	1			1
	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	1			
	<i>Chryseobacterium oncorhynchi</i>	1			
	<i>Chryseobacterium shigense</i>	1	4		
	<i>Chryseobacterium sp.</i>		1	2	2
	Total for phylum	4	5	2	3
<i>Deinococcus-Thermus</i> (1.2%)	<i>Deinococcus sp.</i>			2	
	<i>Deinococcus xinjiangensis</i>	1			
	Total for phylum	1	0	2	0
<i>Firmicutes</i> (33.2%)	<i>Bacillus cereus</i>	2			
	<i>Bacillus pumilus</i>			1	
	<i>Bacillus sp.</i>		2		
	<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	2	2		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2	1	1	1
	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	3	2	1	2
	<i>Staphylococcus devriesei</i>	1	3	3	
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4	2	5	2
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		1	1	
	<i>Staphylococcus sp.</i>	1	1		
	<i>Aerococcus viridans</i>				1
	<i>Enterococcus faecium</i>				2
	<i>Enterococcus gilvus</i>			1	
	<i>Lactobacillus casei</i>		5	5	9

	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1	2	3	1
	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>		1	1	
	<i>Lactobacillus paracasei</i>		1		
	<u><i>Leuconostoc citreum</i></u>	1			
	<i>Lactococcus lactis</i>	2	1		
	<i>Streptococcus uberis</i>				1
	Total for group	19	24	22	19
<i>Proteobacteria</i> (27.7%)	<i>Brevundimonas aurantiaca</i>	2			
	<i>Brevundimonas intermedia</i>	3			
	<i>Brevundimonas nasdae</i>		1		
	<i>Brevundimonas sp.</i>	4	4	1	3
	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	2	2		1
	<i>Ochrobactrum rhizosphaerae</i>	1	1		1
	<u><i>Devosia sp.</i></u>		1		
	<i>Rhizobium radiobacter</i>			1	
	<i>Rhizobium sp.</i>		1		
	<u><i>Shinella zoogloeoides</i></u>	2			
	<i>Paracoccus yeei</i>	1			
	<i>Sphingomonas melonis</i>	2			
	<i>Sphingomonas sp.</i>				1
	<u><i>Variovorax paradoxus</i></u>	1			
	<i>Escherichia coli</i>	1			
	<i>Pseudomonas sp.</i>				1
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	16	4	1	
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>		3		
	<i>Stenotrophomonas sp.</i>		2	3	3
	Total for phylum	35	19	6	10
Total identified		83	69	52	49

Values reported are the mean from triplicate milk samples (n=3)

¹ The underlined genera were not detected by 16S rRNA genes metabarcoding in raw milks

² EXT = extensive grazing system; ³SEMI = semi-intensive grazing system

Table S3. Differentially abundant taxa on teat skin in July between EXT ($n=3$) and SEMI ($n=3$) systems as determined by the LDA method¹.

Taxa	N°OTU	System ²		Standard deviation		LDA score	pval
		EXT	SEMI	EXT	SEMI		
Taxa more abundant in EXT							
<i>Actinobacteria</i>							
Corynebacterium sp.	OTU12	3.95	0.96	2.23	0.26	4.166	0.0495
Corynebacterium sp.	OTU137	0.27	0.02	0.18	0.02	3.119	0.0495
Corynebacterium sp.	OTU183	0.19	-	0.24	-	3.096	0.0369
Corynebacterium sp.	OTU444	0.09	<0.01	0.06	0.00	2.713	0.0463
Coriobacteriia (c)		1.72	0.60	0.66	0.17	4.242	0.0495
Coriobacteriales (o)		1.72	0.60	0.66	0.17	4.198	0.0495
Coriobacteriaceae (f)		1.72	0.60	0.66	0.17	3.763	0.0495
Atopobium sp.		1.53	0.46	0.70	0.15	3.742	0.0495
Atopobium sp.	OTU112	0.67	0.05	0.36	0.03	3.512	0.0495
Atopobium sp.	OTU124	0.36	0.05	0.19	0.07	3.207	0.0495
Atopobium sp.	OTU130	0.35	0.11	0.23	0.04	3.096	0.0495
Gordonibacter sp.	OTU329	0.07	0.01	0.03	0.01	2.945	0.0495
<i>Firmicutes</i>							
Solibacillus sp.	OTU205	0.10	0.06	0.01	0.04	2.760	0.0495
Aerococcus sp.		2.39	0.41	2.54	0.19	3.982	0.0495
Christensenellaceae (f)	OTU146	0.50	0.07	0.22	0.06	3.366	0.0495
Christensenellaceae (f)	OTU193	0.10	0.02	0.03	0.01	2.797	0.0495
Christensenellaceae (f)	OTU227	0.09	0.01	0.05	0.00	2.655	0.0495
Christensenellaceae (f)	OTU58	0.21	0.03	0.13	0.03	2.959	0.0495
Christensenellaceae (f)	OTU268	0.08	0.01	0.05	0.01	2.688	0.0495
Christensenellaceae (f)	OTU285	0.28	0.03	0.23	0.02	3.119	0.0495
Christensenellaceae (f)	OTU303	0.09	-	0.01	-	2.962	0.0369
Christensenellaceae (f)	OTU390	0.15	<0.01	0.17	0.01	2.879	0.0463
Christensenellaceae (f)	OTU398	0.06	0.02	0.02	0.00	2.936	0.0495
Christensenellaceae (f)	OTU402	0.09	0.02	0.05	0.01	2.670	0.0495
Christensenellaceae (f)	OTU530	0.06	0.01	0.05	0.00	2.525	0.0495
Clostridiales FamilyXIII (f)		0.30	0.07	0.16	0.04	3.108	0.0495
Mogibacterium sp.	OTU135	0.30	0.07	0.16	0.04	3.096	0.0495
Lachnospiraceae (f)		4.63	1.47	2.51	0.68	4.213	0.0495
Lachnospiraceae (f)	OTU88	0.56	0.04	0.22	0.05	3.428	0.0495
Lachnospiraceae (f)	OTU156	0.15	0.02	0.12	0.01	2.859	0.0495
Lachnospiraceae (f)	OTU181	0.13	0.04	0.04	0.02	2.743	0.0495
Lachnospiraceae (f)	OTU203	0.27	0.03	0.16	0.01	3.106	0.0495
Lachnospiraceae (f)	OTU232	0.04	-	0.01	-	2.951	0.0369
Lachnospiraceae (f)	OTU243	0.10	0.01	0.05	0.01	2.730	0.0495
Lachnospiraceae (f)	OTU313	0.08	0.01	0.02	0.01	2.725	0.0495
Lachnospiraceae (f)	OTU362	0.08	<0.01	0.00	0.00	2.945	0.0463
Lachnospiraceae (f)	OTU529	0.05	<0.01	0.02	0.01	2.858	0.0495
Acetitomaculum sp.		1.25	0.11	0.65	0.04	3.796	0.0495
Acetitomaculum sp.	OTU37	0.97	0.08	0.56	0.04	3.637	0.0495

Acetitomaculum sp.	OTU264	0.09	<0.01	0.04	0.00	2.725	0.0463
Acetitomaculum sp.	OTU314	0.07	<0.01	0.01	0.00	2.863	0.0463
Acetitomaculum sp.	OTU573	0.05	-	0.03	-	2.529	0.0369
Coprococcus sp.	OTU191	0.19	0.02	0.08	0.02	2.984	0.0495
Ruminococcaceae (f)	OTU230	0.09	<0.01	0.01	0.01	2.991	0.0463
Ruminococcaceae (f)	OTU310	0.13	0.02	0.11	0.01	2.784	0.0495
Ruminococcaceae (f)	OTU342	0.09	<0.01	0.04	0.01	2.727	0.0463
Ruminococcaceae (f)	OTU668	0.07	<0.01	0.08	0.01	2.594	0.0463
Ruminiclostridium sp.	OTU524	0.09	0.01	0.09	0.01	2.748	0.0463
Saccharofermentans sp.	OTU356	0.16	0.04	0.04	0.00	2.871	0.0495
Solobacterium sp.	OTU386	0.05	<0.01	0.03	0.00	2.709	0.0463
Taxa more abundant in SEMI							
<i>Actinobacteria</i>							
Bifidobacteriales (o)		0.48	10.51	0.59	5.69	4.694	0.0495
Bifidobacteriaceae (f)		0.48	10.51	0.59	5.69	4.675	0.0495
Bifidobacterium sp.		0.48	10.51	0.59	5.69	4.674	0.0495
Bifidobacterium pseudolongum	OTU6	0.46	9.90	0.58	5.46	4.640	0.0495
Bifidobacterium choerinum	OTU36	<0.01	0.34	0.00	0.30	3.238	0.0495
Bifidobacterium merycicum	OTU52	0.02	0.27	0.01	0.07	3.118	0.0495
Nocardioideae (f)	OTU363	0.02	0.06	0.00	0.07	3.107	0.0495
Atopobium sp.	OTU75	-	0.15	-	0.02	3.033	0.0369
Atopobium sp.	OTU212	-	0.04	-	0.02	3.026	0.0369
<i>Firmicutes</i>							
Bacillus sp.	OTU141	0.06	0.49	0.03	0.33	3.362	0.0495
Paenibacillus sp.	OTU359	0.05	0.08	0.02	0.00	2.676	0.0495
Sporosarcina sp.	OTU393	0.02	0.06	0.01	0.01	2.891	0.0495
Sporosarcina globispora	OTU316	0.03	0.07	0.01	0.01	2.666	0.0495
Clostridium sp.		0.62	2.35	0.26	0.91	3.989	0.0495
Clostridium sp.	OTU35	0.34	1.89	0.12	0.83	3.881	0.0495
Clostridium sp.	OTU85	0.19	0.40	0.12	0.08	3.032	0.0495
Lachnospiraceae (f)	OTU255	-	0.23	-	0.22	3.134	0.0369
Cellulosilyticum sp.	OTU270	0.03	0.11	0.02	0.06	2.758	0.0495
Ruminococcaceae (f)	OTU197	0.01	0.27	0.01	0.23	3.168	0.0463
Ruminococcaceae (f)	OTU383	0.02	0.12	0.02	0.09	2.831	0.0495
Turicibacter sp.	OTU711	0.01	0.08	0.00	0.03	2.871	0.0495

¹ Average abundances (expressed as percentages) as well as standard deviation are presented for each taxa.

² EXT = extensive grazing system; SEMI = semi-intensive grazing system; taxonomic rank (c): class, (f): family; (o): order

The bold OTUs correspond to the OTUs that contribute the most to the third principal component (PC3) of PLS-DA.

Table S4. Differentially abundant taxa on teat skin in September between EXT ($n=3$) and SEMI ($n=3$) systems as determined by the LDA method¹.

Taxa	N°OTU	System ²		Standard deviation		LDA score	pval
		EXT	SEMI	EXT	SEMI		
Taxa more abundant in EXT							
<i>Actinobacteria</i>							
Corynebacteriales (o)		34.5	17.1	9.23	5.22	4.961	0.0495
Corynebacteriaceae (f)		31.9	15.5	7.49	4.75	5.172	0.0495
Corynebacterium sp.		31.9	15.5	7.49	4.75	4.976	0.0495
Corynebacterium sp.	OTU260	0.36	0.03	0.30	0.01	3.309	0.0495
Gordonibacter sp.	OTU329	0.06	0.01	0.05	0.01	3.331	0.0495
<i>Firmicutes</i>							
Christensenellaceae (f)	OTU370	0.05	0.01	0.03	0.01	3.402	0.0495
Lachnospiraceae (f)	OTU362	0.08	0.01	0.06	0.01	3.185	0.0495
Terrisporobacter sp.	OTU357	0.07	<0.01	0.04	0.00	3.409	0.0463
<i>Proteobacteria</i>							
Aminobacter sp.	OTU169	0.21	0.05	0.15	0.02	3.282	0.0495
Taxa more abundant in SEMI							
<i>Actinobacteria</i>							
Bifidobacteriales (o)		1.55	21.55	0.57	24.89	4.990	0.0495
Bifidobacteriaceae (f)		1.55	21.55	0.57	24.89	4.983	0.0495
Bifidobacterium sp.		1.55	21.55	0.57	24.89	5.021	0.0495
Bifidobacterium pseudolongum	OTU6	1.36	17.50	0.62	20.96	4.904	0.0495
Bifidobacterium choerinum	OTU36	0.07	2.69	0.06	3.28	4.102	0.0495
Bifidobacterium merycicum	OTU52	0.12	1.35	0.13	0.74	3.779	0.0495
Nocardiaceae (f)		0.21	0.31	0.05	0.03	3.073	0.0495
Rhodococcus sp.		0.18	0.30	0.03	0.03	3.385	0.0495
Dermatophilaceae (f)	OTU281	0.03	0.05	0.02	0.01	3.380	0.0495
Agreia sp.	OTU335	0.01	0.04	0.00	0.02	3.424	0.0495
Micromonosporales (o)		0.01	0.03	0.01	0.00	3.781	0.0495
Micromonosporaceae (f)		0.01	0.03	0.01	0.00	3.683	0.0495
Micromonospora sp.	OTU379	0.01	0.03	0.01	0.00	3.810	0.0495
Atopobium sp.	OTU75	0.05	1.15	0.06	0.78	3.758	0.0495
Atopobium sp.	OTU212	<0.01	0.28	0.00	0.36	3.445	0.0463
<i>Firmicutes</i>							
Planococcaceae (f)	OTU302	0.01	0.13	0.02	0.08	3.017	0.0495
Lactococcus sp.		0.18	0.23	0.02	0.04	3.000	0.0495
Lactococcus lactis	OTU1	0.18	0.21	0.01	0.02	3.566	0.0495
Clostridium sp.		0.49	1.18	0.23	0.55	3.581	0.0495
Clostridium sp.	OTU35	0.01	0.07	0.01	0.05	3.369	0.0495
Clostridium hylemonae	OTU271	-	0.11	-	0.09	3.284	0.0495
Clostridium chartababidum	OTU321	0.49	1.18	0.23	0.55	2.996	0.0369
Coprococcus sp.	OTU248	-	0.02	-	0.03	3.260	0.0369
Ruminococcaceae (f)	OTU197	-	0.04	-	0.03	3.217	0.0463

Ruminococcus sp.	OTU216	0.01	0.28	0.01	0.20	3.188	0.0495
Ruminococcus sp.	OTU322	0.01	0.08	0.00	0.05	3.666	0.0495
Ruminococcus sp.	OTU334	0.02	0.11	0.01	0.11	3.131	0.0495

¹ Average abundances (expressed as percentages) as well as standard deviation are presented for each taxa.

² EXT = extensive grazing system; SEMI = semi-intensive grazing system; taxonomic rank (f): family; (o): order

Table S5. Differentially abundant taxa in raw milk **(A)** in July and **(B)** in September between EXT ($n=3$) and SEMI ($n=3$) systems as determined by the LDA method¹.**A**

Taxa	System ²		Standard deviation		LDA score	pval
	EXT	SEMI	EXT	SEMI		
Taxa more abundant in EXT						
<i>Firmicutes</i>						
Clostridia Clostridiales Lachnospiraceae	0.33	0.06	0.19	0.06	3.546	0.0495
<i>Proteobacteria</i>						
Gammaproteobacteria	3.48	0.14	2.98	0.08	4.308	0.0495
Gammaproteobacteria Pseudomonadales	3.09	0.01	2.47	0.02	4.234	0.0463

B

Taxa	System ²		Standard deviation		LDA score	pval
	EXT	SEMI	EXT	SEMI		
Taxa more abundant in EXT						
<i>Actinobacteria</i>						
Actinobacteria Corynebacteriales Nocardiaceae Rhodococcus_otu100	3.26	0.82	1.07	1.32	4.209	0.0495
Actinobacteria Micrococcales Micrococcaceae Kocuria_otu72	0.09	-	0.12	-	4.131	0.0339
Taxa more abundant in SEMI						
<i>Firmicutes</i>						
Clostridia Clostridiales Lachnospiraceae	0.05	0.46	0.05	0.33	3.841	0.0463
Clostridia Clostridiales Lachnospiraceae_otu203	-	0.29	-	0.28	3.888	0.0369

¹ Average abundances (expressed as percentages) as well as standard deviation are presented for each taxa.

² EXT = extensive grazing system; SEMI = semi-intensive grazing system

Table S6. Differentially abundant taxa in cheese core (A) in July and (B) in September between EXT ($n=3$) and SEMI ($n=3$) systems as determined by the LDA method¹.**A**

Taxa	System ²		Standard deviation		LDA score	pval
	EXT	SEMI	EXT	SEMI		
Taxa more abundant in EXT						
<i>Firmicutes</i>						
Bacilli Lactobacillales Lactobacillaceae	1.52	0.66	0.83	0.32	4.028	0.0495
Bacilli Lactobacillales Lactobacillaceae Lactobacillus L.helveticus_otu27	0.62	0.09	0.42	0.07	3.436	0.0495
Bacilli Lactobacillales Lactobacillaceae Lactobacillus L.parabuchneri_otu57	0.11	0.04	0.02	0.03	2.977	0.0495
Bacilli Lactobacillales Lactobacillaceae Lactobacillus_otu180	0.04	0.01	0.02	0.00	2.845	0.0495
Bacilli Lactobacillales Lactobacillaceae Lactobacillus_otu229	0.06	0.01	0.05	0.01	2.524	0.0495
Taxa more abundant in SEMI						
<i>Fusobacteria</i>						
Fusobacteriia Fusobacteriales Fusobacteriaceae Fusobacterium_otu223	0.03	0.16	0.03	0.09	2.999	0.0495

B

Taxa	System ²		Standard deviation		LDA score	pval
	EXT	SEMI	EXT	SEMI		
Taxa more abundant in EXT						
<i>Proteobacteria</i>						
Gammaproteobacteria Enterobacteriales	0.13	-	0.18	-	2.914	0.0369
Gammaproteobacteria Enterobacteriales Enterobacteriaceae	0.13	-	0.18	-	2.905	0.0369
Gammaproteobacteria Pseudomonadales Pseudomonadaceae Pseudomonas P.putida_otu326	0.02	-	0.02	-	2.185	0.0369
Taxa more abundant in SEMI						
<i>Firmicutes</i>						
Bacilli Lactobacillales Lactobacillaceae Lactobacillus_otu315	-	0.02	-	0.01	2.407	0.0339
Bacilli Lactobacillales Streptococcaceae Streptococcus	0.03	0.11	0.02	0.03	2.627	0.0495
Bacilli Lactobacillales Streptococcaceae Lactococcus L.lactis_otu46	0.09	0.36	0.07	0.08	3.153	0.0495
Bacilli Lactobacillales Streptococcaceae Lactococcus_otu139	0.02	0.07	0.01	0.03	2.440	0.0495
Bacilli Lactobacillales Streptococcaceae Lactococcus_otu175	0.02	0.06	0.01	0.03	2.307	0.0495
Bacilli Lactobacillales Streptococcaceae Lactococcus_otu48	0.07	0.30	0.06	0.09	3.048	0.0495
Bacilli Lactobacillales Streptococcaceae Lactococcus_otu89	0.06	0.23	0.05	0.03	2.922	0.0495

¹ Average abundances (expressed as percentages) as well as standard deviation are presented for each taxa.² EXT = extensive grazing system; SEMI = semi-intensive grazing system

Table S7. Differentially abundant taxa in cheese rind (A) in July and (B) in September between EXT ($n=3$) and SEMI ($n=3$) systems as determined by the LDA method¹.**A**

Taxa	System ²		Standard deviation		LDA score	pval
	EXT	SEMI	EXT	SEMI		
Taxa more abundant in EXT						
<i>Firmicutes</i>						
Bacilli Lactobacillales Lactobacillaceae Lactobacillus L.helveticus_otu27	0.72	0.16	0.49	0.02	3.499	0.0495
Bacilli Lactobacillales Lactobacillaceae Lactobacillus_otu229	0.05	0.01	0.04	0.01	2.536	0.0495
Taxa more abundant in SEMI						
<i>Bacteroidetes</i>						
Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Chryseobacterium_otu372	-	0.02	-	0.01	2.649	0.0495
<i>Firmicutes</i>						
Bacilli Lactobacillales Streptococcaceae Lactococcus L.lactis_otu214	-	0.01	-	0.01	2.770	0.0495
Bacilli Lactobacillales Streptococcaceae Lactococcus_otu48	0.06	0.18	0.01	0.04	2.878	0.0495

B

Taxa	System ²		Standard deviation		LDA score	pval
	EXT	SEMI	EXT	SEMI		
Taxa more abundant in EXT						
Proteobacteria						
Gammaproteobacteria Enterobacteriales Enterobacteriaceae Escherichia E.coli_otu90	0.15	0.004	0.25	0.002	2.958	0.0495
Taxa more abundant in SEMI						
Actinobacteria						
Actinobacteria Micrococcales Brevibacteriaceae Brevibacterium_otu94	0.26	0.41	0.06	0.06	2.969	0.0495
Firmicutes						
Bacilli Lactobacillales Streptococcaceae Lactococcus L.lactis_otu46	0.07	0.23	0.05	0.09	2.924	0.0495
Bacilli Lactobacillales Streptococcaceae Lactococcus_otu48	0.06	0.31	0.05	0.14	3.135	0.0495
Bacilli Lactobacillales Streptococcaceae Lactococcus_otu89	0.04	0.21	0.03	0.08	3.006	0.0495

¹ Average abundances (expressed as percentages) as well as standard deviation are presented for each taxa.² EXT = extensive grazing system; SEMI = semi-intensive grazing system

Table S8. Average percentage of relative abundance of 133 OTUs present in at least two habitats. The 9 OTUs detected in all habitats were framed.


Taxa	N°otu	Teat skin (n=12)	Milk (n=12)	Core (n=12)	Rind (n=12)
<i>Actinobacteria</i>					
<i>Brevibacterium sp</i>	OTU4	0.01	0.06	0.02	12.8
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	OTU6	7.31	0.38		
<i>Corynebacterium sp</i>	OTU8	5.87	1.58		
<i>Brevibacterium linens</i>	OTU11		0.05		1.87
<i>Corynebacterium sp</i>	OTU12	3.62	0.83		
<i>Brachybacterium sp</i>	OTU15	0.01	0.04		1.22
<i>Corynebacterium sp</i>	OTU17	1.70	1.01		
<i>Bifidobacterium sp</i>	OTU18		10.7		0.01
<i>Dietzia sp</i>	OTU19	1.34	0.85		
<i>Corynebacterium sp</i>	OTU20	1.37	0.86		
<i>Corynebacterium sp</i>	OTU21	1.36	0.11		
<i>Corynebacterium sp</i>	OTU22	1.28	0.24		
<i>Corynebacterium sp</i>	OTU25	1.12	0.16		
<i>Corynebacterium sp</i>	OTU32	0.84	0.38		
<i>Rhodococcus sp</i>	OTU33	0.04	6.10		
<i>Bifidobacterium choerinum</i>	OTU36	0.78	0.06		
<i>Brevibacterium sp</i>	OTU42	0.07			0.51
<i>Brachybacterium sacelli</i>	OTU44	0.03			0.30
<i>Bifidobacterium merycicum</i>	OTU52	0.44	0.3		
<i>Yaniella sp</i>	OTU54	0.01			0.24
<i>Nocardioides sp</i>	OTU55	0.51	0.03		
<i>Corynebacterium sp</i>	OTU56	0.61	0.03		
<i>Pseudoclavibacter helvolus</i>	OTU58	0.35	0.31		
<i>Arthrobacter sp</i>	OTU66	0.36	0.14		
<i>Kocuria sp</i>	OTU72	0.33	0.03		
<i>Atopobium sp</i>	OTU75	0.34	0.02		
<i>Corynebacterium lactis</i>	OTU76	0.63	0.02		
<i>Micrococcus sp</i>	OTU78	0.39	0.12		
<i>Micrococcus sp</i>	OTU79	0.29	0.01		
<i>Tetrasphaera sp</i>	OTU91	0.29	0.02		
<i>Dietzia lutea</i>	OTU99	0.25	0.02		
<i>Rhodococcus sp</i>	OTU100	0.02	2.25		
<i>Atopobium sp</i>	OTU112	0.38	0.02		
<i>Nocardioides sp</i>	OTU120	0.27	0.02		
<i>Atopobium sp</i>	OTU124	0.27	0.02		
<i>Dietzia cercidiphylli</i>	OTU127	0.01	0.01		0.09
<i>Atopobium sp</i>	OTU130	0.27	0.01		
<i>Corynebacterium sp</i>	OTU137	0.17	0.02		
<i>Janibacter sp</i>	OTU153	0.22	0.07		0.02

<i>Nocardioides daphniae</i>	OTU157	0.13	0.07		
<i>Kocuria sp</i>	OTU174	0.01	0.64		0.01
<i>Micrococcus sp</i>	OTU234	0.09	0.04		
<i>Corynebacterium bovis</i>	OTU269	0.02	0.3		
<i>Corynebacterium variabile</i>	OTU328		0.04		0.02
<i>Agreia sp</i>	OTU335	0.05	0.07		
<i>Rhodococcus sp</i>	OTU397	0.01	0.21		
<i>Leucobacter sp</i>	OTU404	0.10	0.16		
Bacteroidetes					
<i>Chryseobacterium sp</i>	OTU372		0.25	0.01	0.01
Firmicutes					
<i>Lactococcus lactis</i>	OTU1	0.23	11.6	97.4	69.7
<i>Romboutsia sp</i>	OTU3	14.6	1.85		
<i>Intestinibacter sp</i>	OTU7	6.42	0.87		
<i>Turicibacter sp</i>	OTU9	5.59	1.53		
<i>Peptoclostridium sp</i>	OTU10	5.58	0.30		
<i>Lactobacillus sp</i>	OTU13	0.01	6.61	0.42	0.60
<i>Staphylococcus sp</i>	OTU16	2.37	0.80	0.10	0.25
<i>Bacillus sp</i>	OTU24	0.02	6.71		
<i>Lactobacillus helveticus</i>	OTU27		3.45	0.23	0.27
<i>Bacillus sp</i>	OTU29	1.03	0.09		
<i>Jeotgalicoccus sp</i>	OTU34	1.39	0.04		0.08
<i>Aerococcus sp</i>	OTU26	1.21	0.04		
<i>Clostridium sp</i>	OTU35	0.80	0.04		
<i>Acetitomaculum sp</i>	OTU37	0.73	0.05		
<i>Lactococcus sp</i>	OTU39			0.42	0.21
<i>Lactococcus lactis</i>	OTU46			0.16	0.11
<i>Lactococcus sp</i>	OTU48	0.01	0.06	0.12	0.15
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	OTU51	0.29	0.25	0.06	0.10
<i>Streptococcus sp</i>	OTU53	0.04	4.04	0.03	0.06
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	OTU57		0.16	0.06	0.27
<i>Proteiniclasticum sp</i>	OTU60	0.52	0.07		
<i>Aerococcaceae</i>	OTU62	0.72	0.01		
<i>Enterococcus sp</i>	OTU63	0.02	0.48		0.11
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	OTU67	0.36	0.40	0.01	
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	OTU81	0.12	0.26	0.02	0.03
<i>Clostridium sp</i>	OTU85	0.27	0.04		
<i>Lachnospiraceae</i>	OTU88	0.24	0.03		
<i>Lactococcus sp</i>	OTU89			0.10	0.09
<i>Lactococcus sp</i>	OTU93			0.11	0.04
<i>Turicibacter sp</i>	OTU95	0.23	0.01		
<i>Facklamia sp</i>	OTU96	0.29	0.02		
<i>Staphylococcus equorum</i>	OTU114	0.02	0.01		0.11
<i>Ruminococcaceae</i>	OTU122	0.44	0.21		
<i>Marvinbryantia sp</i>	OTU132	0.30			

<i>Mogibacterium sp</i>	OTU135	0.22	0.09		
<i>Lactococcus sp</i>	OTU139			0.04	0.03
<i>Christensenellaceae</i>	OTU146	0.29	0.01		
<i>Lactococcus sp</i>	OTU152			0.07	0.05
<i>Lachnospiraceae</i>	OTU156	0.10	0.04		
<i>Christensenellaceae</i>	OTU164	0.11	0.04		
<i>Lactococcus sp</i>	OTU175			0.04	0.04
<i>Lactobacillus brevis</i>	OTU177			0.02	0.03
<i>Lactobacillus sp</i>	OTU180			0.02	0.03
<i>Lachnospiraceae</i>	OTU181	0.15	0.01		
<i>Lactococcus sp</i>	OTU185			0.07	0.06
<i>Ruminococcaceae</i>	OTU186	0.18	0.01		
<i>Ruminococcaceae</i>	OTU197	0.08	0.13		
<i>Lactococcus lactis</i>	OTU200			0.03	0.02
<i>Lactobacillus sp</i>	OTU202			0.03	0.03
<i>Lachnospiraceae</i>	OTU203	0.20	0.07		
<i>Ruminococcaceae</i>	OTU206	0.15	0.02		
<i>Streptococcus pluranimalium</i>	OTU209	0.06	0.32		
<i>Lactococcus lactis</i>	OTU214			0.02	0.01
<i>Lactobacillus helveticus</i>	OTU229			0.02	0.02
<i>Lactobacillus sp</i>	OTU235			0.02	0.02
<i>Lactococcus sp</i>	OTU242			0.01	0.01
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	OTU251			0.01	0.04
<i>Christensenellaceae</i>	OTU258	0.12	0.10		
<i>Planomicrobium sp</i>	OTU295			0.02	0.01
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	OTU311			0.02	0.02
<i>Lactobacillus sp</i>	OTU315			0.01	0.01
<i>Lachnospiraceae</i>	OTU327	0.06	0.02		
<i>Streptococcus sp</i>	OTU330			0.02	0.01
<i>Ruminococcaceae</i>	OTU339	0.06	0.06		
<i>Paenibacillus sp</i>	OTU359	0.04	0.03		
<i>Lactococcus lactis</i>	OTU385			0.02	0.01
<i>Christensenellaceae</i>	OTU402	0.07			
<i>Fastidiosipila sp</i>	OTU417	0.03		0.01	0.01
<i>Fusobacteria</i>					
<i>Fusobacterium sp</i>	OTU223			0.05	0.01
<i>Proteobacteria</i>					
<i>Sphingomonas sp</i>	OTU14	0.24	19.6		
<i>Paracoccus sp</i>	OTU61	0.67	0.16		
<i>Escherichia coli</i>	OTU90	0.01	0.01	0.05	0.07
<i>Cupriavidus gilardii</i>	OTU98	0.01	1.43		
<i>Sphingomonas sp</i>	OTU101	0.20	0.41		
<i>Brevundimonas sp</i>	OTU103	0.02	1.11		
<i>Pseudomonas sp</i>	OTU104		0.73	0.01	0.04
<i>Paracoccus sp</i>	OTU107	0.36	0.01		
<i>Sphingomonadaceae changbaiensis</i>	OTU173	0.01	0.58		
<i>Bradyrhizobium sp</i>	OTU267	0.04	0.11		

<i>Rhizobium sp</i>	OTU288	0.08	0.04		
<i>Acinetobacter guillouiae</i>	OTU299		0.06	0.01	0.01
<i>Acinetobacter sp</i>	OTU312		0.31	0.02	
<i>Pseudomonas putida</i>	OTU326			0.01	0.02
<i>Klebsiella sp</i>	OTU486			0.01	0.02
<i>Bosea sp</i>	OTU622	0.02	0.04		

Annexe 3 : Tableaux supplémentaires correspondants aux résultats du dispositif 2**Tableau S1.** Protéolyse des fromages au lait cru selon l'origine de la crème à 90 et 150 jours d'affinage

Proteolysis	Feed		Time		SEM	Effects and significance		
	PAT <i>n=6</i>	MAIS <i>n=6</i>	D90 <i>n=6</i>	D150 <i>n=6</i>		F	T	F*T
WSN/N (%)	17.4	16.9	14.4	20.0	0.876	ns	***	ns
PTSN/WSN (%)	20.5	23.2	16.3	27.3	2.013	ns	*	ns
PTSN/N (%)	3.69	4.11	2.35	5.46	0.522	ns	**	ns

Values reported are the mean from triplicate cheese samples (n=3)

Abbreviations are: D90: 90 days of ripening; D150: 150 days of ripening; F: cow feeding; T: time of ripening; N: nitrogen; WSN: water-soluble nitrogen; PTSN: phosphotungstic acid soluble nitrogen; SEM: standard error of the means.

• P < 0.10; * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; ns = not significant

Tableau S2. Protéolyse des fromages au lait pasteurisé selon l'origine de la crème à 90 et 150 jours d'affinage

Proteolysis	Feed		Time		SEM	Effects and significance		
	PAT <i>n=6</i>	MAIS <i>n=6</i>	D90 <i>n=6</i>	D150 <i>n=6</i>		F	T	F*T
WSN/N (%)	16.8	16.5	14.1	19.2	0.814	ns	***	ns
PTSN/WSN (%)	20.6	18.9	11.4	28.1	2.798	ns	**	ns
PTSN/N (%)	3.64	3.34	1.60	5.38	0.613	ns	**	ns

Values reported are the mean from triplicate cheese samples (n=3)

Abbreviations are: D90: 90 days of ripening; D150: 150 days of ripening; F: cow feeding; T: time of ripening; N: nitrogen; WSN: water-soluble nitrogen; PTSN: phosphotungstic acid soluble nitrogen; SEM: standard error of the means.

• P < 0.10; * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; ns = not significant

Tableau S3. Niveau de population des principaux groupes microbiens dans la croûte des fromages en fin d'affinage (à 150 jours d'affinage) selon l'origine de la crème

Presumed microbial group (log UFC/g)	Cru			Pasteurisé		
	PAT	MAIS	pvalue	PAT	MAIS	pvalue
Total mesophilic bacteria	8.20±0.63	7.75±0.26	0.320	7.77±0.48	7.54±0.72	0.675
Lactic acid bacteria	6.90±0.30	6.89±0.14	0.948	5.88±0.35	5.94±0.07	0.786
Heterofermentative facultative <i>Lactobacillus</i>	6.80±0.33	6.96±0.12	0.486	<1	<1	
Gram-positive catalase- positive bacteria	10.1±0.09	10.2±0.12	0.237	9.25±0.37	9.37±0.42	0.736
Gram-negative bacteria	6.22±0.53	6.05±0.23	0.632	6.42±0.37	6.21±0.13	0.409
<i>Pseudomonas</i>	6.28±0.08	6.31±0.16	0.740	6.39±0.16	6.40±0.16	0.941
<i>Enterococcus</i>	6.52±0.37	5.92±0.78	0.297	3.47±0.55	3.61±0.67	0.793
Yeast	5.10±0.71	4.24±0.43	0.146	5.44±0.19	5.14±0.26	0.179
Mould	5.47±0.22	5.77±0.24	0.184	5.34±0.23	5.32±0.43	0.955

Values reported are the mean from triplicate cheese samples (n=3) ± standard deviation.

<1 = below detection threshold

Tableau S4. Profil en composés volatils des fromages

N	Compounds	RI	Raw			Pasteurized		
			Pasture	Maize	pvalue	Pasture	Maize	pvalue
Aldehydes								
1	acetaldehyde		4.93±0.03	4.90±0.09	0.578	4.96±0.04	4.75±0.06	0.008
2	butanal	597	4.25±0.09	3.94±0.13	0.028	4.28±0.17	4.18±0.07	0.447
3	pentanal	702	5.59±0.22	5.11±0.11	0.027	5.89±0.17	5.40±0.06	0.009
4	hexanal	804	5.79±0.12	5.63±0.14	0.196	5.51±0.11	5.47±0.08	0.641
5	heptanal	906	5.36±0.13	4.87±0.13	0.010	5.23±0.17	5.20±0.22	0.856
6	octanal	1009	4.73±0.13	4.49±0.15	0.099	4.69±0.11	4.79±0.14	0.365
7	nonanal	1111	4.70±0.12	4.67±0.18	0.823	4.73±0.12	4.90±0.29	0.404
8	propenal	491	3.34±0.27	3.41±0.29	0.780	3.50±0.24	3.38±0.09	0.480
9	2-butenal	651	3.65±0.32	3.55±0.29	0.705	3.89±0.42	3.50±0.10	0.195
10	2-pentenal	759	3.70±0.23	3.21±0.30	0.088	3.71±0.30	3.47±0.19	0.303
11	2-hexenal	858	3.84±0.35	3.64±0.44	0.574	4.04±0.38	3.83±0.17	0.426
12	2,4-hexadienal	916	2.99±0.20	2.75±0.30	0.312	3.17±0.34	2.86±0.09	0.199
13	2-heptenal	963	4.09±0.38	3.92±0.56	0.691	4.01±0.32	3.95±0.20	0.783
14	2,4-heptadienal	1019	3.67±0.34	3.19±0.42	0.193	3.70±0.42	3.33±0.25	0.252
15	2-octenal	1066	3.70±0.34	3.58±0.39	0.707	3.58±0.34	3.61±0.27	0.923
16	2-nonenal	1169	0.93±1.61	0.71±1.23	0.863	1.52±1.39	1.60±1.39	0.948
17	2-methyl-propanal	556	4.40±0.45	4.54±0.12	0.636	4.77±0.44	4.83±0.19	0.854
18	3-methyl-butanal	655	5.17±0.75	5.45±0.12	0.561	5.18±0.54	5.46±0.38	0.499
19	2-methyl-butanal	666	4.29±0.69	4.49±0.08	0.663	4.40±0.55	4.50±0.17	0.776
20	2-methyl-propenal	569	3.60±0.32	3.53±0.29	0.789	3.79±0.15	3.64±0.11	0.233
21	benzaldehyde	973	4.59±0.22	4.67±0.22	0.666	5.02±0.43	5.07±0.21	0.882
22	benzene-acetaldehyde	1057	3.65±0.32	3.71±0.24	0.808	3.76±0.25	3.79±0.07	0.847
Alcohols								
23	methanol		2.64±0.10	3.06±0.20	0.030	2.81±0.13	2.95±0.28	0.494
24	ethanol	463	6.60±0.04	6.53±0.26	0.711	6.43±0.07	6.30±0.22	0.394
25	1-propanol	560	5.29±0.33	5.31±0.42	0.949	4.88±0.37	4.91±0.47	0.950
26	1-butanol	667	5.75±0.20	5.67±0.12	0.581	4.49±0.30	4.58±0.62	0.848
27	1-pentanol	771	5.48±0.17	4.96±0.17	0.018	5.19±0.09	4.72±0.03	0.001
28	1-hexanol	872	5.16±0.24	5.36±0.06	0.221	4.63±0.60	4.53±0.11	0.794
29	1-heptanol	973	4.47±0.13	4.25±0.11	0.087	4.34±0.07	4.12±0.18	0.116
30	1-octanol	1075	3.07±0.22	3.12±0.18	0.792	2.99±0.31	3.00±0.24	0.986
31	1-penten-3-ol	687	3.63±0.22	3.20±0.28	0.107	3.64±0.32	3.18±0.12	0.079
32	1-octen-3-ol	984	3.26±0.27	3.40±1.01	0.823	3.08±0.59	3.10±0.27	0.951
33	2-propanol	507	5.61±0.10	6.06±0.07	0.003	5.47±0.07	5.47±0.14	0.986
34	2-butanol	607	6.27±0.26	6.23±0.36	0.889	4.74±0.04	4.62±0.25	0.477
35	2-pentanol	704	4.28±0.05	4.65±0.06	0.002	3.89±0.07	3.76±0.26	0.432
36	2-heptanol	903	5.49±0.07	5.66±0.07	0.031	5.31±0.04	5.20±0.26	0.528
37	3-octanol	1000	2.56±0.18	2.71±0.15	0.329	2.53±0.03	2.58±0.19	0.704
38	2-methyl-1-propanol	630	5.17±0.59	5.48±0.18	0.434	5.00±0.42	5.12±0.10	0.658
39	3-methyl-1-butanol	740	5.71±0.91	6.28±0.27	0.359	5.43±0.90	5.70±0.21	0.636
40	2-methyl-1-butanol	743	4.88±0.93	5.33±0.35	0.475	4.62±0.58	4.70±0.11	0.842
41	2-methyl-2-propanol	533	3.44±0.02	3.56±0.09	0.077	3.46±0.03	3.48±0.10	0.837
42	3-methyl-2-butanol	685	3.92±0.14	3.79±0.20	0.406	3.67±0.10	3.39±0.28	0.193
43	3-methyl-3-buten-1-ol	736	4.10±0.03	4.10±0.10	0.940	4.16±0.06	4.10±0.17	0.622
44	4-methyl-2-pentanol	762	5.19±0.06	5.02±0.05	0.023	5.13±0.09	4.85±0.27	0.165
45	3-methyl-2-buten-1-ol	780	3.41±0.08	3.43±0.14	0.791	3.47±0.19	3.49±0.30	0.939
46	3-methyl-2-pentanol	795	4.15±0.14	3.56±0.33	0.046	3.85±0.15	3.01±0.08	0.001

Ketones								
47	2-propanone	500	4.84±0.12	5.12±0.16	0.071	5.45±0.32	5.97±0.06	0.049
48	2-butanone	604	5.28±0.14	5.30±0.38	0.938	5.25±0.08	5.53±0.04	0.005
49	2-pentanone	691	4.59±0.12	5.12±0.39	0.086	5.11±0.25	5.81±0.18	0.017
50	3-hexanone	789	2.87±0.33	3.12±0.56	0.545	3.32±0.15	3.56±0.10	0.087
51	2-hexanone	794	3.36±0.10	3.76±0.35	0.135	3.51±0.07	4.19±0.23	0.008
52	4-heptanone	877	2.96±0.11	2.77±0.20	0.216	2.92±0.16	2.85±0.19	0.653
53	3-heptanone	891	1.44±0.31	0.71±1.22	0.371	1.63±0.56	1.89±0.50	0.576
54	2-heptanone	894	4.89±0.07	5.49±0.41	0.120	5.27±0.05	5.81±0.36	0.117
55	3-octanone	992	2.65±0.22	2.93±0.43	0.379	2.78±0.21	3.02±0.14	0.173
56	2-octanone	996	3.22±0.04	3.67±0.35	0.159	3.29±0.07	3.82±0.39	0.139
57	4-nonanone	1079	1.40±0.17	0.58±1.01	0.291	2.11±0.37	2.05±0.36	0.844
58	2-nonanone	1097	4.36±0.03	4.96±0.39	0.121	4.40±0.08	4.89±0.54	0.260
59	3-buten-2-one	592	3.48±0.19	3.36±0.13	0.428	3.55±0.16	3.62±0.19	0.630
60	1-penten-3-one	690	3.82±0.16	3.46±0.32	0.163	3.83±0.23	3.84±0.10	0.955
61	1-octen-3-one	984	3.53±0.19	3.53±0.41	0.999	3.45±0.24	3.40±0.10	0.724
62	8-nonen-2-one	1089	0.91±1.58	3.96±0.65	0.037	-	3.80±0.85	0.001
63	2,3-butanedione	593	4.84±0.14	4.98±0.13	0.275	5.49±0.34	5.94±0.07	0.086
64	2,3-pentanedione	699	3.75±0.18	3.33±0.31	0.118	3.96±0.35	3.92±0.18	0.857
65	3-hydroxy-2-butanone	716	3.47±0.26	3.86±0.05	0.060	4.43±0.56	5.18±0.06	0.083
66	2,3-hexanedione	798	2.49±0.19	2.17±0.38	0.262	2.56±0.25	2.44±0.36	0.649
67	2,3-octanedione	987	4.44±0.35	3.85±0.33	0.101	4.41±0.34	4.02±0.25	0.179
68	3-methyl-2-butanone	661	3.36±0.16	3.50±0.22	0.405	3.61±0.20	3.92±0.06	0.068
69	4-methyl-2-pentanone	743	4.12±0.07	4.22±0.33	0.622	4.58±0.07	4.65±0.23	0.662
70	3-methyl-2-pentanone	757	3.75±0.19	3.61±0.70	0.754	4.07±0.29	4.00±0.17	0.750
71	3-methyl-2-heptanon	952	2.69±0.09	2.68±0.15	0.928	2.99±0.07	2.85±0.17	0.277
72	6-methyl-2-heptanone	960	2.99±0.34	2.82±0.39	0.603	2.98±0.27	2.89±0.09	0.636
73	6-methyl-5-hepten-2-one	992	3.60±0.20	3.54±0.14	0.708	3.76±0.24	3.84±0.12	0.662
74	cyclopentanone	747	2.36±0.54	2.60±0.35	0.566	2.73±0.29	2.84±0.16	0.606
75	1-phenyl-ethanone	1081	3.11±0.27	3.28±0.23	0.441	3.24±0.26	3.41±0.34	0.530
Esters								
76	methyl acetate	528	2.99±0.15	3.50±0.40	0.105	2.89±0.13	2.93±0.30	0.855
77	methyl butanoate	726	3.37±0.03	3.81±0.05	<0.001	3.35±0.03	3.50±0.18	0.309
78	methyl hexanoate	928	3.25±0.09	3.71±0.12	0.005	2.80±0.33	2.74±0.20	0.797
79	methyl benzoate	1109	1.56±0.06	2.67±0.55	0.072	2.16±1.03	2.26±0.97	0.903
80	methyl octanoate	1129	2.29±0.29	3.28±0.27	0.013	1.23±2.13	2.57±0.45	0.344
81	methyl 3-methyl-butanoate	780	-	1.36±1.20	0.122	0.61±1.06	-	0.374
82	ethyl acetate	617	5.93±0.09	6.23±0.51	0.415	5.27±0.05	5.20±0.17	0.518
83	ethyl propanoate	716	3.65±0.10	3.93±0.3	0.201	2.82±0.23	3.15±0.19	0.136
84	ethyl butanoate	804	6.24±0.09	6.11±0.14	0.259	5.67±0.10	5.61±0.16	0.606
85	ethyl pentanoate	903	4.36±0.11	4.38±0.19	0.874	3.47±0.10	3.53±0.17	0.636
86	ethyl hexanoate	1002	6.29±0.14	6.18±0.20	0.496	5.09±0.03	4.99±0.16	0.379
87	ethyl heptanoate	1101	3.80±0.16	3.92±0.29	0.571	1.84±0.17	1.46±1.34	0.671
88	ethyl octanoate	1200	4.33±0.11	4.27±0.34	0.801	3.02±0.06	2.99±0.16	0.760
89	ethyl 2-methyl-propanoate	762	2.31±0.39	1.98±0.07	0.224	-	-	-
90	ethyl 2-methyl-butanoate	854	2.62±0.08	2.17±0.34	0.086	-	-	-
91	ethyl 3-methyl-butanoate	857	3.00±0.14	2.90±0.15	0.467	-	-	-
92	propyl acetate	718	3.56±0.27	3.84±0.48	0.428	2.75±0.16	2.71±0.21	0.819
93	propyl butanoate	901	3.45±0.35	3.57±0.24	0.646	2.73±0.10	2.80±0.60	0.855
94	propyl hexanoate	1098	2.62±0.65	2.96±0.29	0.459	0.46±0.79	1.17±1.05	0.402

95	butyl acetate	818	4.15±0.18	4.14±0.20	0.929	3.33±0.09	3.32±0.24	0.973
96	butyl butanoate	999	3.08±0.33	3.09±0.14	0.962	1.26±1.18	0.59±1.02	0.498
97	pentyl acetate	917	3.24±0.07	3.27±0.17	0.835	2.81±0.27	2.71±0.08	0.581
98	pentyl acetate	917	2.78±0.37	2.82±0.45	0.924	0.66±1.15	-	0.374
99	hexyl acetate	1016	0.85±1.47	3.16±0.44	0.059	1.79±1.58	0.60±1.03	0.337
100	isopropyl acetate	664	2.83±0.01	4.01±0.57	0.070	1.38±1.36	1.99±0.24	0.485
101	isopropyl butanoate	846	2.82±0.07	3.27±0.28	0.057	2.76±0.27	2.48±0.80	0.598
102	2-pentyl acetate	853	0.60±1.04	2.81±0.92	0.051	-	-	-
103	2-methyl-propyl acetate	777	2.68±0.83	3.38±0.47	0.274	2.34±0.78	1.73±1.51	0.568
104	2-methyl-propyl butanoate	959	3.26±0.67	3.63±0.19	0.408	3.04±0.31	3.06±0.39	0.950
105	3-methyl-butyl acetate	880	4.27±1.02	4.85±0.57	0.438	3.23±1.09	3.06±0.50	0.818
106	3-methyl-butyl butanoate	1060	3.13±1.13	3.84±0.30	0.351	2.94±0.91	2.66±0.81	0.710
107	2-methyl-butyl acetate	883	2.81±0.73	3.22±0.50	0.467	2.59±0.68	2.16±0.45	0.415
108	2-methyl-butyl butanoate	1063	2.15±1.23	2.93±0.36	0.349	2.11±0.90	1.88±0.74	0.746
109	2-ethyl-hexyl acetate	1155	3.47±0.10	2.42±0.43	0.015	3.63±0.09	2.79±0.17	0.001
Sulphur compounds								
110	methanethiol	422	3.06±0.24	2.92±0.37	0.612	3.45±0.25	3.32±0.11	0.458
111	propanethiol	623	2.64±0.61	2.66±0.75	0.981	3.04±0.45	2.98±0.27	0.847
112	methional	912	3.05±0.65	3.16±0.68	0.851	3.55±0.66	3.53±0.40	0.956
113	S-methyl thioacetate	705	3.64±0.07	3.74±0.08	0.216	2.92±1.05	3.62±0.41	0.344
114	dimethyl-sulfide	521	2.21±0.19	2.27±0.38	0.806	2.72±0.37	2.56±0.49	0.677
115	dimethyl-disulfide	751	5.16±0.35	5.22±0.41	0.843	5.41±0.34	5.11±0.12	0.220
116	dimethyl-trisulfide	986	3.58±0.22	3.56±0.29	0.941	4.07±0.53	3.68±0.24	0.309
117	carbon-disulfide	539	3.15±0.33	3.33±0.77	0.730	3.09±0.46	3.03±0.91	0.922
118	2,4-dithiapentane	899	3.25±0.26	3.34±0.36	0.733	3.23±0.27	2.98±0.17	0.247
119	methyl-thioethane	617	1.22±1.07	1.50±1.31	0.785	1.89±0.24	1.81±0.46	0.808
Furan compounds								
120	2-methyl-furan	608	3.36±0.19	3.17±0.14	0.226	3.12±0.03	2.98±0.14	0.208
121	3-methyl-furan	616	2.91±0.05	2.81±0.08	0.147	3.05±0.03	2.87±0.12	0.060
122	2-ethyl-furan	706	3.55±0.12	3.20±0.14	0.030	3.68±0.16	3.38±0.16	0.040
123	2-propyl-furan	795	2.56±0.03	2.21±0.26	0.147	2.47±0.10	2.33±0.16	0.101
124	2-butyl-furan	898	2.50±0.08	2.34±0.14	0.179	2.53±0.02	2.46±0.16	0.170
125	2-pentyl-furan	998	3.40±0.21	3.21±0.08	0.216	3.37±0.06	3.37±0.14	0.921
126	2-hexyl-furan	1099	2.48±0.06	2.34±0.16	0.226	2.36±0.10	2.45±0.05	0.253
127	2,5-dimethyl-furan	712	2.72±0.45	2.73±0.33	0.992	2.98±0.19	2.87±0.27	0.590
128	2,4-dimethyl-furan	718	3.44±0.28	3.42±0.41	0.941	3.39±0.25	3.35±0.20	0.860
129	2,3-dimethyl-furan	721	2.43±0.51	1.79±0.45	0.181	2.45±0.52	2.30±0.42	0.732
130	furfural	839	2.89±0.06	2.90±0.14	0.931	3.10±0.13	3.05±0.11	0.679
Others								
131	methyl-benzene	773	5.55±0.05	4.68±0.15	<0.001	5.55±0.03	4.73±0.15	0.009
132	methyl-thiocyanate	718	4.13±0.29	4.06±0.45	0.831	4.37±0.22	4.02±0.07	0.052

Tableau S5. Profil en acides gras volatils des fromages en fin d'affinage (à 150 jours d'affinage) selon l'origine de la crème

Volatile fatty acids (mg/100 g)	Cru			Pasteurisé		
	PAT	MAIS	pvalue	PAT	MAIS	pvalue
Acetic acid (C2)	65.8±23.2	48.6±8.16	0.293	53.1±12.5	46.1±12.0	0.520
Propionic acid (C3)	0.24±0.22	0.12±0.03	0.448	0.07±0.03	0.07±0.02	0.652
Isobutyric acid (<i>iso</i> C4)	0.07±0.03	0.04±0.01	0.163	0.03±0.00	0.08±0.03	0.027
Butyric acid (C4)	8.46±0.76	7.55±1.34	0.367	6.64±1.75	6.55±1.63	0.951
Isovaleric acid (<i>iso</i> C5)	0.26±0.07	0.33±0.02	0.195	0.21±0.09	0.46±0.12	0.039
Isocaproic acid (<i>iso</i> C6)	0.04±0.02	0.04±0.01	0.621	0.03±0.02	0.05±0.01	0.155
Caproic acid (C6)	3.81±0.82	3.66±0.85	0.836	2.99±1.00	2.51±0.28	0.464

Values reported are the mean from triplicate cheese samples (n=3) ± standard deviation.

pvalue are in bold when the statistical Student's t-Test when $P < 0.05$, and in italic when $0.05 < P < 0.10$.

Annexe 4 : Définitions des descripteurs sensoriels du Cantal

ASPECT DE LA CROÛTE :	Collant : relatif à la force nécessaire pour ôter le produit qui adhère à l'intérieur de la cavité buccale.
Couleur de fond : permet de juger la couleur de fond de la croûte sans tenir compte du boutonné et autres développements	Granuleux : en bouche, perception en cours de mastication, de particules plus ou moins dures et de taille variable.
Couleur du boutonné : permet de juger uniquement la couleur du boutonné sur le talon.	FLAVEUR :
Relief du boutonné : plus le boutonné est en relief sur le talon plus le chiffre attribué est élevé. Le relief se juge au toucher.	Intensité de la flaveur : c'est l'intensité globale de la flaveur, quelles que soient ses composantes.
Quantité (boutonné) : permet de juger la quantité de boutons sur le talon.	Saveurs :
ASPECT DE LA PÂTE :	Salé : c'est la saveur de base salée perçue sur la langue. Produit de référence : chlorure de sodium. (5 = ni excès ni manque de sel.)
Couleur de la pâte : permet d'évaluer l'intensité de la couleur de la pâte. (0 = blanche, 5 = jaune pâle, 10 = jaune paille)	Acide : c'est la saveur de base acide perçue sur la langue. Produit de référence : acide tartrique ou citrique.
Pâte persillée : la pâte est persillée lorsqu'elle présente des fentes.	Amer : c'est la saveur de base amère perçue sur la langue. Produit de référence : chlorhydrate de quinine ou caféine.
Pâte marbrée : la pâte présente des zones plus claires par endroit.	Sensations intra-buccales :
ODEUR : se juge en cassant le morceau	Piquant : sensation se traduisant par des picotements perçus dans la bouche y compris sur le palais et la langue.
Intensité de l'odeur : c'est l'intensité de l'odeur globale, quelles que soient ses composantes.	Arômes :
Odeur de crème fraîche : odeur lactique, rappelant celle de la crème fraîche.	Arôme de crème fraîche : arôme lactique, rappelant celle de la crème fraîche.
Odeur de crème fermentée : odeur lactique fermentée, proche de la vieille crème.	Arôme de crème fermentée : arôme lactique fermenté, proche de la vieille crème.
Odeur de beurre : odeur rappelant celle du beurre frais.	Arôme de beurre : arôme lactique rappelant celle du beurre frais.
Odeur de jaune d'œuf : odeur de jaune d'œuf cuit (soufflé).	Arôme de pâte cuite : arôme de l'emmental, du gruyère.
Odeur de pâte cuite : odeur de l'emmental, du gruyère.	Arôme de champignon : arôme du champignon.
Odeur de levure : odeur rappelant celle de la levure de boulangerie, exemple : brioche.	Arôme d'étable : arôme rappelant l'ambiance de l'étable : animal, végétal
Odeur de vanille : odeur rappelant celle de la vanille.	Arôme rance : arôme lié à la dégradation de la matière grasse d'un produit qui en est riche. Exemple : beurre rance, gras de jambon sec vieilli.
Odeur de plastique : odeur de plastique, chimique.	Arôme de plastique : arôme de plastique, chimique.
TEXTURE AU TOUCHER :	Après dégustation :
Ferme : relatif à la force nécessaire pour déformer le produit. (0=mou, 5=ferme, 10=dur)	Persistance de la flaveur : C'est la durée pendant laquelle la flaveur reste en bouche après avoir avalé le produit.
Souple : relatif à la capacité du produit à reprendre sa position initiale après déformation.	Observations : permet de noter une dominante après dégustation ou un arrière goût (sensation qui apparaît après élimination du produit et qui diffère des sensations perçues lorsque le produit était en bouche).
TEXTURE EN BOUCHE :	
Fondant : aptitude du produit à se déliter ou se dissoudre en bouche.	

Annexe 5 : Liste des communications

Communications orales

Frétin M.

Construction de la qualité sensorielle des fromages de type Cantal : rôle des interactions entre les communautés microbiennes et la composition de la matière grasse laitière des fromages.

Journée des doctorants et post-doctorants de l'Unité Mixte de Recherches sur les Herbivores (UMRH), Mon projet en 180 secondes, INRA Theix, 24 février 2015

Bathfield B., Frétin M., Menassol J.B.

Systèmes d'Elevage Laitiers Innovants en Auvergne : SyEL-InAuv

Journée des doctorants et post-doctorants de l'Unité Mixte de Recherches sur les Herbivores (UMRH), INRA Theix, 24 février 2015

Frétin M., Ferlay A., Montel M.C., Rifa E., Martin B., Delbès C.

La diversité bactérienne de fromages de type Cantal en lien avec deux systèmes de production laitiers

20^e Club des Bactéries Lactiques, Lille, 17 au 19 juin 2015

Frétin M.

Rôle de la composition de la matière grasse laitière et des communautés bactériennes dans le développement des caractéristiques sensorielles des fromages

Journée des doctorants et post-doctorants de l'Unité Mixte de Recherches sur les Herbivores (UMRH), INRA Theix, 03 mars 2016

Frétin M., Ferlay A., Montel M.C., Fournier F., Martin B., Delbès C.

Effet de la composition de la matière grasse du lait sur la dynamique bactérienne en fromage

Rencontre des microbiologistes clermontois, Clermont-Ferrand, 5 avril 2016

Frétin M., Martin B., Bord C., Pereira D., Montel M.C., Cirié C., Fournier F., Delbès C., Ferlay A.

Are the specific sensory properties of pasture cheeses linked to milk fat composition and bacterial dynamics?

Mountain pastures and livestock farming facing uncertainty: environmental, technical and socio-economic challenges, 19th Meeting of the FAO – CIHEAM Mountain Pastures, 14-16 Juin 2016, Saragosse (Espagne)

Frétin M., Martin B., Rifa E., Bord C., Pereira D., Montel M.C., Cirié C., Fournier F., Ferlay A., Delbès C.

Are the specific sensory properties of pasture cheeses linked to milk fat composition and microbial dynamics?

The Science of Artisan Cheese, 23-24 août 2016, North Cadbury Court, Somerset (Angleterre)

Frétin M., Martin B., Rifa E., Verdier-Metz I., Pomiès D., Ferlay A., Montel M.C., Delbès C.

L'assemblage de la communauté bactérienne de la peau des trayons des vaches jusqu'aux fromages affinés.

XII^{ème} Journée de l'animation transversal Glande mammaire Lait, 17-18 novembre 2016, Saint Genès-Champagnelle

Communications sous forme de poster

Frétin M., Ferlay A., Martin B., Montel MC., Delbès C.

Impact des systèmes laitiers innovants sur les flux microbiens des laits aux fromages en interaction avec la composition biochimique des fromages et conséquences sur leurs caractéristiques sensorielles

Journée de l'Ecole doctorale, Clermont-Ferrand (France), 12 et 13 juin 2014

Frétin M., Ferlay A., Martin B., Montel MC., Delbès C.

Impact des systèmes laitiers innovants sur les flux microbiens des laits aux fromages en interaction avec la composition biochimique des fromages et conséquences sur leurs caractéristiques sensorielles

Journée de restitution du projet Systèmes d'élevage laitiers innovants en Auvergne (SyEl-InAuv), Clermont-Ferrand (France), 9 décembre 2014

Frétin M., Rifa E., Ferlay A., Montel MC., Martin B., Delbès C.

Bacterial diversity in Cantal-type cheeses revealed by 16S rRNA-based metabarcoding sequencing

3rd International conference on microbial diversity: the challenge of complexity, Perugia (Italie), 27 au 29 octobre 2015

Frétin M., Ferlay A., Bord C., Pereira D., Montel M.C., Martin B., Delbès C.

Effect of fat composition on the development of bacterial communities in Cantal-type cheeses

IDF Dairy Science & Technology Symposia 2016, 6th Cheese Ripening and Technology Symposium, Dublin (Irlande), 11 au 13 avril 2016

Communications au grand public

Frétin M.

Construction de la qualité sensorielle des fromages de type Cantal : rôle des interactions entre les communautés microbiennes et la composition de la matière grasse laitière des fromages

Echange doctorants-lycéens organisé par le Rectorat, Aurillac le 26 février 2015 et Mauriac le 17 mars 2015

Frétin M.

Bar des Sciences « Microbes : amis ou ennemis »

Baie des Singes (Cournon), 7 avril 2015

Frétin M.

La peau des trayons des vaches : un réservoir potentiel de diversité bactérienne pour les laits crus et les fromages au lait cru

Auvergnescience.com