



HAL
open science

Les bactériophages : un facteur biotique à prendre en compte pour comprendre les successions microbiennes en surface du fromage et mieux maîtriser l'affinage

Thomas Paillet

► To cite this version:

Thomas Paillet. Les bactériophages : un facteur biotique à prendre en compte pour comprendre les successions microbiennes en surface du fromage et mieux maîtriser l'affinage. Microbiologie et Parasitologie. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASB013 . tel-04122173

HAL Id: tel-04122173

<https://pastel.hal.science/tel-04122173>

Submitted on 8 Jun 2023

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.

Les bactériophages : un facteur biotique à prendre en compte pour comprendre les successions microbiennes en surface du fromage et mieux maîtriser l'affinage

Bacteriophages: a biotic factor to consider for understanding the microbial successions on the cheese rind and to better control cheese ripening

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 581, Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

Spécialité de doctorat : Microbiologie
Graduate School : Biosphera. Référent : AgroParisTech

Thèse préparée dans les UMR **SayFood** (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech) et **Micalis Institute** (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech), sous la direction d'**Eric DUGAT-BONY**, Chargé de Recherche (ADR), le co-encadrement de **Marie-Agnès PETIT**, Directrice de Recherche

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 28 février 2023, par

Thomas PAILLET

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Claire LE HENAFF-LE MARREC

Professeure, INP Bordeaux Aquitaine

Présidente & Rapporteur

Christophe CHASSARD

Directeur de Recherche, INRAE (centre Auvergne-Rhône-Alpes)

Rapporteur & Examineur

Sarah CHUZEVILLE

Chef de projet, Actalia

Examinatrice

Jérôme MOUNIER

Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Examineur

Titre : Les bactériophages : un facteur biotique à prendre en compte pour comprendre les successions microbiennes en surface du fromage et mieux maîtriser l'affinage

Mots clés : bactériophages, fromage à croûte lavée, écologie microbienne, métagénomique virale

Résumé : Le fromage est un aliment fermenté : sa fabrication fait intervenir divers microorganismes, dont la succession contrôlée aboutit à un produit fini de qualité. Parmi les acteurs de la fermentation, les bactéries jouent un rôle majeur lors de l'acidification du lait, qui conduit à la formation du caillé, et de l'affinage, où elles contribuent à la génération des propriétés sensorielles du produit dont la couleur, l'odeur, le goût ou encore la texture. Cependant, au sein de l'écosystème fromager, elles sont soumises à la prédation des bactériophages, également appelés phages, qui sont des virus de bactéries. Si ces parasites naturels sont bien connus pour perturber l'étape d'acidification du lait, leur impact écologique sur les communautés microbiennes lors de l'affinage du fromage reste à déterminer. De précédents travaux en rapport avec cette question ont permis d'observer la présence de phages à la surface de plusieurs fromages affinés. L'analyse du métavirome de la surface d'un fromage à pâte molle et à croûte lavée (PMCL) a également permis de détecter des séquences génomiques phagiques. Leurs homologues dans les bases de données correspondent à des génomes de phages connus pour infecter des bactéries appartenant à des taxons classiquement retrouvés lors de l'affinage de ce type de fromage. Sur cette base, deux approches complémentaires ont été mises en place au cours de ce travail, afin de poursuivre l'exploration des communautés virales d'une variété de fromage PMCL.

Dans un premier temps, une approche culture-dépendante a permis d'isoler cinq phages infectant des bactéries d'affinage à partir de la surface de ce fromage, dont quatre sont totalement nouveaux. Leur caractérisation a également fourni de premiers indices sur leur fonctionnement dans l'écosystème fromager. En particulier, les phages isolés sont virulents et ont un spectre d'hôtes étroit. Dans un second temps, le suivi de la communauté phagique au cours de l'affinage de ce fromage par une approche de métagénomique virale a permis de mettre en évidence une dynamique, tant en termes de composition de cette communauté qu'en termes d'abondance des différents phages détectés. Ce résultat suggère que les phages infectent effectivement des bactéries lors de l'affinage et qu'ils sont donc susceptibles d'influer sur la dynamique microbienne de l'écosystème fromager. Enfin, l'étude de la composition de la communauté virale de ce fromage à partir d'échantillons provenant de productions séparées de plusieurs années a permis d'observer que les phages les plus abondants à la surface du fromage persistent sur le long terme. Ce travail apporte ainsi de nouvelles connaissances relatives à l'écologie microbienne du fromage, en soulignant l'importance potentielle des phages pendant la phase d'affinage. Il offre également de nouvelles pistes de recherche pour mieux maîtriser cette étape clé de la production fromagère.

Title : Bacteriophages: a biotic factor to consider for understanding the microbial successions on the cheese rind and to better control cheese ripening

Keywords : bacteriophages, smear-ripened cheese, microbial ecology, viral metagenomics

Abstract : Cheese is a fermented food whose production involves various microorganisms. Their controlled succession ensures the production of a high-quality product. Among these microorganisms, bacteria play a major role in milk acidification, allowing coagulation and curd production, and in the ripening process, where they are known to contribute to sensory properties such as colour, odour, taste and texture. However, in cheese they are subject to predation by bacterial viruses, also called bacteriophages or phages. These natural parasites are well known to disturb the milk acidification step, but their ecological impact on the microbial community of cheese during ripening remains under-explored. Recent work has shown the presence of phages on the surface of several ripened cheeses. In addition, viral metagenomics analysis of the surface of a smear-ripened cheese allowed the detection of diverse phage genomic sequences related to phages known to infect bacteria belonging to taxa typically present on the cheese rind. In this work, two complementary approaches were used to explore the viral community of a smear-ripened cheese.

Their characterisation also provided first clues as to their mode of action in the cheese ecosystem. In particular, all are virulent and have a narrow host range. Secondly, we used a viral metagenomics approach to monitor the phage community on the cheese surface during the ripening process. This revealed a dynamic, both in terms of composition of this community and in terms of the abundances of the different phages detected. This result indicates that phages do infect bacteria during the ripening process, and suggests that they are likely to influence microbial successions in the cheese ecosystem. Finally, the composition of the viral community of cheeses collected from productions separated by several years was studied by the same approach. We observed that the most abundant phages on the cheese surface persist for a long time in the cheese production environment. In conclusion, this work provides new insights into the microbial ecology of cheese, highlighting the potential importance of phages during the ripening process. It also offers new avenues of research to better control this key step of cheese production.

Remerciements

La thèse étant un travail d'équipe, je souhaite remercier ici toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à son aboutissement.

Je souhaite tout d'abord remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer mon travail : mesdames Claire Le Hénaff-Le Marrec et Sarah Chuzeville ainsi que messieurs Christophe Chassard et Jérôme Mounier.

Ensuite, mes remerciements vont à mes deux encadrants, Eric Dugat-Bony et Marie-Agnès Petit, qui m'ont formé à la recherche scientifique au cours de ces trois années.

Eric, je te remercie de m'avoir choisi pour porter ce sujet de thèse, et d'avoir été à l'écoute afin de le faire évoluer vers une dimension plus appliquée. J'emporte avec moi ton enthousiasme pour l'écologie microbienne.

Marie-Agnès, un grand merci pour avoir eu la patience de répondre à mes -très- nombreuses questions tout au long de ma thèse, et pour le rôle indispensable que tu as joué dans ma préparation et ma réussite au concours de l'école doctorale ABIES. Longue vie aux phages !

Je te tiens également à remercier le personnel de mon laboratoire principal, l'UMR SayFood, et plus particulièrement l'équipe CoMiAl qui m'a accueillie en début de thèse.

Au sein de cette équipe, mes plus sincères remerciements vont à Françoise Irlinger, Christophe Monnet et Pascal Bonnarne pour leur disponibilité et leur expertise.

Je n'oublie pas Anne-Sophie Sarthou, sainte patronne des labos microbio et bio mol, pour son aide précieuse en début de thèse : c'est grâce à toi si je suis parti sur d'aussi bonnes bases !

Du côté de mon deuxième laboratoire, je remercie les membres de l'équipe Phages de l'Institut Micalis de m'avoir adopté, tout simplement.

Julien Lossouarn, je te remercie de m'avoir pris sous ton aile, j'ai énormément appris à ton contact : de la culture des phages à la l'annotation de leur génome, en passant par la microscopie, tu as été un excellent professeur au laboratoire, et un très bon camarade en-dehors.

Aux doctorants de l'équipe Phages, Maud Billaud, Romain Sausset et Pauline Misson, mes « aînés », merci pour cette belle complicité.

A François Lecointe, Olivier Son, Quentin Lamy-Besnier et Elisabeth Moncaut, toute ma sympathie.

A l'excellent Francis Repoila pour sa bonne humeur et son soutien lors de la préparation de ma soutenance.

A Anne-Sophie Boucard, pour tous les chouettes moments passés ensemble.

Je souhaite également remercier, pour leur soutien technique :

Christine Longin, de la plateforme Mima2, pour son aide dans la préparation et l'observation de mes phages en Microscopie électronique à transmission.

Cédrix Midoux et Olivier Rué, de la plateforme Migale pour les formations dispensées, leur implication dans mes analyses bio-informatiques et surtout leur expertise avancée en débogage de scripts.

Je tiens aussi à dire un immense merci à tous les stagiaires que j'ai eu le plaisir de former :

Clarisse Figueroa (M2), Inès Pedros (IUT) et Thomas Clerc (APT).

A tous les stagiaires que j'ai eu le plaisir de côtoyer, et qui ont adouci ces trois années de thèse. Mention spéciale pour Sara Cajamarca, alias mon hibou, et Léa Erb pour tous les bons moments partagés.

Aux élèves d'Agroparistech impliqués dans le module « La recherche et moi », et en particulier Léone Gentet pour sa curiosité et son implication.

Plus globalement, toute mon affection va aux élèves d'Agroparistech des promotions 194 à 197, qui malgré le Covid, m'ont permis de m'évader et de connaître les joies qu'une grande école d'ingénieurs peut offrir. Mention spéciale à mes équipes de handball successives et à Chloé Lloyd, ma monitrice d'équitation, pour m'avoir accueilli si chaleureusement.

A mes amis, pour avoir toujours été là pour moi. Mention spéciale à Hugo, Clément et Guillaume qui sont venus de loin pour assister à ma soutenance !

Enfin, je remercie ma famille pour son soutien :

A mon grand-père pour ses belles lettres d'encouragement.

A mes parents, qui m'ont toujours soutenu dans mes études, j'espère vous avoir rendus fiers. Promis, c'étaient les dernières !

Pour conclure, un petit mot pour mon cadet, Adrien, qui marche dans mes pas : courage, la délivrance approche !

Sommaire

Introduction générale	1
Synthèse bibliographique.....	7
Partie I – Le fromage : un aliment ancien et ultramoderne	9
1. Définition : Qu'est-ce qu'un fromage ?	9
2. De l'origine à l'expansion mondiale du fromage	10
3. Evolution des pratiques de fabrication : l'exemple des fromages au lait cru	10
4. La fabrication du fromage.....	11
4.1. La matière première : le lait	11
4.2. Le procédé général de fabrication du fromage	13
4.3. Le cas particulier des fromages à pâte molle et croûte lavée (PMCL).....	17
4.3.1. Caractéristiques générales	17
4.3.2. L'affinage des fromages PMCL.....	17
5. Les signes de qualité	19
Partie II – Le microbiote du fromage : une communauté contrôlée	22
1. Les microorganismes du fromage.....	22
1.1. Les bactéries lactiques : SLAB et NSLAB (starter et non-starter lactic acid bacteria)	22
1.2. Les autres bactéries.....	25
1.2.1. Les bactéries d'affinage de surface	25
1.2.2. Les bactéries d'altération et les pathogènes	26
1.3. Les levures et les champignons filamenteux.....	27
1.4. Le microbiote des fromages à pâte molle et à croûte lavée (PMCL)	29
2. Origine des microorganismes du fromage	30
2.1. Le microbiote du lait	31
2.1.1. Les bactéries du lait	32
2.1.2. Les champignons du lait.....	33
2.2. Les ferments	33
2.2.1. Les ferments lactiques	33
2.2.2. Les ferments d'affinage	34
2.3. Les microorganismes indigènes.....	34
3. Les pratiques permettant de contrôler le microbiote du fromage.....	36

Partie III- Les bactériophages.....	38
2. Caractéristiques des phages.....	38
2.1. Les cycles de vie.....	40
2.1.1. La phase de recherche extracellulaire.....	40
2.1.2. L'attachement.....	41
2.1.3. La réplication.....	43
2.2. Echec de l'infection et mécanismes de défense.....	45
2.2.1. Phages contre phages.....	45
2.2.2. Défenses de l'hôte.....	46
3. Les bactériophages dans l'industrie laitière.....	47
3.1. Les phages des ferments lactiques.....	47
3.2. Les phages de bactéries non acidifiantes.....	48
3.3. L'utilisation des phages pour la bioprotection du fromage.....	50
3.3.1. Le biocontrôle des bactéries d'altération.....	50
3.3.2. Le biocontrôle des bactéries pathogènes.....	51
3.4. Les sources de contamination.....	53
4. Le contrôle des bactériophages en industrie laitière.....	53
5. Les méthodes d'études des phages dans les aliments.....	56
5.1. Les méthodes de comptage des particules.....	56
5.2. Les méthodes basées sur l'isolement.....	57
5.2.1. Les méthodes de microscopie.....	57
5.2.2. Les paramètres de croissance.....	58
5.2.3. Le spectre d'hôtes.....	59
5.2.4. Séquençage et annotation des génomes de phage.....	60
5.3. Les méthodes basées sur la PCR.....	60
5.4. La métagénomique virale.....	61
Partie IV – Ecologie microbienne du fromage.....	63
1. Les successions microbiennes dans l'écosystème fromager.....	64
2. Les principaux facteurs abiotiques.....	66
2.1. Le pH.....	66
2.2. La température.....	67
2.3. Le sel.....	69
2.4. L'humidité relative (HR).....	72

3. Les interactions microbiennes	72
3.1. La compétition pour les ressources.....	74
3.2. Le commensalisme.....	75
3.3. L'amensalisme.....	76
3.4. Le mutualisme.....	76
3.5. Le parasitisme et la prédation	77
CHAPITRE 1	79
Les phages dans les aliments fermentés : un facteur biotique à considérer ?.....	79
Avant-propos.....	81
Démarche	81
Bacteriophage ecology of fermented foods: anything new under the sun?	83
Discussion.....	106
CHAPITRE 2.....	109
Isolement et caractérisation de bactériophages de la surface d'un fromage à pâte molle et croûte lavée et recherche de leurs réservoirs	109
Avant-propos.....	111
Démarche	111
Principaux résultats.....	112
Virulent phages isolated from a smear-ripened cheese are also detected in reservoirs of the cheese factory	114
Discussion.....	140
CHAPITRE 3.....	143
Etude de la dynamique des bactériophages de la surface d'un fromage à pâte molle et croûte lavée durant le procédé d'affinage et de la stabilité du virome sur le long terme	143
Avant-propos.....	145
Démarche	145
Principaux résultats.....	146
Dynamic of the viral community of the cheese surface during the ripening process and persistence across production years.....	149
Discussion.....	170
Discussion générale et perspectives.....	172
Bibliographie	180

Liste des figures

Figure 1 : Etapes clés de fabrication des principales variétés de fromages français (d'après (Almena-Aliste et Mietton 2014)).	17
Figure 2 : Carte de France des 46 fromages bénéficiant d'une AOP (d'après (AOP-CNAOL 2022a)).	21
Figure 3 : Métabolisme du lactose par les bactéries lactiques du lait (d'après (Macori et Cotter 2018)).	23
Figure 4 : Production de métabolites par des LAB (d'après (Coelho et al. 2022)).	24
Figure 5 : Les sources des microorganismes du fromage (d'après (Irlinger et al. 2015a)).	31
Figure 6 : Production d'un ferment naturel (indéfini) à partir de lait ou de lactosérum (d'après (Parente et al. 2017)).	34
Figure 7 : La structure des phages caudés (d'après (Nobrega et al. 2018)). A noter que les familles <i>Myoviridae</i> , <i>Siphoviridae</i> et <i>Podoviridae</i> , ainsi que l'ordre des <i>Caudovirales</i> auquel elles appartenaient n'existent plus (Turner et al. 2021). Les phages caudés sont désormais regroupés dans la classe des <i>Caudoviricetes</i> (ICTV 2022).	39
Figure 8 : Les récepteurs des bactéries (d'après (Nobrega et al. 2018)). Légende : LPS = lipopolysaccharide.	42
Figure 9 : Les trois principaux cycles des phages (d'après (Chevallereau et al. 2022)). Légende : VT = Vertical Transfer ; HT = Horizontal Transfer.	45
Figure 10 : <i>Gluconobacter</i> phage GC1 fixé en coloration négative (A et B) ou cryo-fixées (C et D) (d'après (Chaïb et al. 2020)).	58
Figure 11 : Cycle de croissance d'un phage (d'après (Course Hero 2022), consulté le 16/11/2022).	59
Figure 12 : Les successions microbiennes de la surface du fromage expliquées par l'association des facteurs biotiques et abiotiques (d'après (Mayo et al. 2021)).	63
Figure 13 : Dénombrement des bactéries et des levures à la surface de l'Epoisses entre les jours 6 et 90 (d'après (Irlinger et Monnet 2021)).	65
Figure 14 : Abondances relatives des espèces bactériennes à la surface d'un Epoisses en cours d'affinage (d'après (Irlinger et Monnet 2021)).	65
Figure 15 : Evolution du pH à la surface d'un Epoisses au cours de son affinage (d'après (Irlinger et Monnet 2021)).	66
Figure 16 : Taux de croissance de différentes catégories de microorganismes en fonction du pH (d'après (LibreTexts 2020), consulté le 17/11/22).	67
Figure 17 : Taux de croissance de différentes catégories de microorganismes en fonction de la température (d'après (Microbiology Notes 2022)).	69
Figure 18 : Catégories de microorganismes en fonction de leur tolérance au sel (d'après (WetLab [sans date])).	71
Figure 19 : Les types d'interactions entre individus (d'après (Faust et Raes 2012)).	73
Figure 20 : Disponibilités des ressources en azote dans l'Epoisses (d'après (Irlinger et Monnet 2021)).	74

Figure 21 : Mécanismes hypothétiques décrivant la relation mutualiste entre *B. aurantiacum* et *H. alvei*, tiré de (Pham et al. 2019).....77

Liste des tableaux

Tableau I : Effet de la race sur la composition chimique du lait de vache (adapté de (Panthi et al. 2017)).....	13
Tableau II : Les origines des LAB du lait cru (d'après (Montel et al. 2014b)).....	32
Tableau III : Les moyens de contrôle des phages en industrie laitière, traduit à partir de (Marcó et al. 2012).....	55
Tableau IV : Caractéristiques typiques de différents fromages (d'après (Guinee et Fox 2017)).	70
Tableau V : A_w minimale requise à la croissance de différents microorganismes (d'après (Guinee et Fox 2017))......	71

Liste des abréviations

AB : agriculture biologique

AOC : appellation d'origine contrôlée

AOP : appellation d'origine protégée

b : bases

CDC : cahier des charges

db : double brin

kb : kilobase

HR : humidité relative

IGP : indication géographique protégée

INAO : institut national de l'origine et de la qualité

LAB : lactic acid bacteria

LPS: lipopolysaccharide

MET: microscopie électronique en transmission

MOI: multiplicity of infection

NSLAB : non-starter lactic acid bacteria

pb : paires de bases

PES : polyéthersulfone

PMCL : pâte molle et croûte lavée

RBP : receptor binding protein

sb : simple brin

SLAB : starter lactic acid bacteria

STG: spécialité traditionnelle garantie

UFC : unité formant colonie

UFP : unité formant plaque

Introduction générale

Les recherches en écologie ont pour but de comprendre le fonctionnement des écosystèmes, initialement conceptualisés par Tansley, ce qui représente un défi scientifique de taille (Tansley 1935). En effet, le nombre de paramètres à intégrer est souvent très important, même pour les systèmes les plus simples (Gaucherel et al. 2020). L'écologie microbienne se concentre sur les écosystèmes microbiens, c'est-à-dire ceux dont la composante biotique est constituée de microorganismes, qu'ils soient naturels, dirigés ou construits (Konopka 2009). Être capable d'identifier les facteurs biotiques et abiotiques, et l'impact de chacun d'entre-eux sur la dynamique spatio-temporelle des populations qui constituent l'écosystème fournit des leviers pour mieux les contrôler. L'étude des procédés de fermentation alimentaires s'inscrit parfaitement dans cette démarche. En effet, leur bon déroulement tient à la maîtrise des successions microbiennes qui s'opèrent au cours du procédé et qui sont en grande partie responsables des qualités finales du produit (Caplice et Fitzgerald 1999; Bauer et Dicks 2004).

Les aliments fermentés, comme le fromage, représentent une part importante de la consommation alimentaire mondiale. Il est en effet estimé qu'ils constituent entre 5 et 40% du bol alimentaire journalier à l'heure actuelle et que le marché des produits et ingrédients fermentés passera de 512,19 milliards de dollars en 2018 à 689,34 M\$ en 2023 (Tamang et Kailasapathy 2010; BIS Research 2019). Il est donc pertinent, à la fois du point de vue scientifique et du point de vue économique de chercher à mieux comprendre comment fonctionnent ces écosystèmes particuliers.

Différentes approches peuvent être mises en œuvre pour aborder cette problématique. L'approche culture-dépendante consiste à isoler des microorganismes à partir de leur environnement d'origine, puis à les caractériser de manière individuelle. Cette approche, relativement simple à mettre en œuvre, a néanmoins pour limite de n'étudier qu'une fraction de la communauté microbienne, exclusivement composée de microorganismes cultivables sur les milieux de culture utilisés. Elle ne rend donc pas forcément compte fidèlement de la structure de la communauté naturellement présente dans l'échantillon d'origine (Wagner et al. 1993). Pour porter un regard plus exhaustif sur la composition des écosystèmes microbiens, des approches de métagénomique, qui consistent à étudier le matériel génétique de l'ensemble des microorganismes présents dans un échantillon, sont désormais disponibles et ne cessent d'être améliorées (Ercolini 2013; Segata et al. 2013). Néanmoins, elles comportent aussi des limites. En effet, puisque ce sont les acides nucléiques qui sont analysés, les

microorganismes correspondants ne sont pas forcément viables au moment du prélèvement de l'échantillon. De plus, elles ne permettent pas d'observer les interactions entre microorganismes. Une autre approche, qualifiée d'écologie synthétique, propose d'étudier une reproduction simplifiée de l'écosystème d'origine dans un modèle de laboratoire (Zomorodi et Segrè 2016). Une communauté microbienne relativement simple, comprenant généralement moins d'une dizaine de souches pures, est assemblée puis cultivée *in vitro* dans un milieu ou une matrice simulant les conditions naturelles de l'écosystème d'origine. Son intérêt principal est de recréer, en conditions contrôlées, une partie des interactions microbiennes présentes dans l'écosystème naturel et de pouvoir intervenir sur des paramètres biotiques et abiotiques du système afin de les étudier. Il est enfin possible d'utiliser des approches de modélisation, qui consistent à mettre en équation les paramètres de l'écosystème, qu'il soit naturel ou synthétique, pour étudier *in silico* son fonctionnement (Song et al. 2014). La force de ces approches est qu'elles parviennent à intégrer les différentes échelles d'un écosystème, de la cellule à la population entière (Succurro et al. 2017). Elles permettent aussi d'accéder à une dimension prédictive, en modifiant les paramètres *in silico* pour tester leur effet sur la dynamique d'une population donnée.

L'ensemble de ces approches ont été utilisées pour décrire la composition et le fonctionnement des communautés microbiennes dans de nombreux aliments fermentés. Ces études ont permis d'identifier les principaux facteurs abiotiques ainsi que plusieurs interactions microbiennes (facteurs biotiques) qui expliquent les transitions microbiennes observées au cours des fermentations. Parmi ces facteurs biotiques, les bactériophages (ou phages), qui sont des prédateurs de bactéries, ont été identifiés comme agents perturbateurs des fermentations, en particulier celles associées aux produits laitiers comme le fromage. En effet, les bactériophages infectant les bactéries lactiques sont bien connus pour perturber l'étape d'acidification du lait et donc sa coagulation (Garneau et Moineau 2011). En revanche, l'impact des phages sur l'étape d'affinage des fromages est beaucoup moins documenté. Seules quelques études rapportent l'isolement de phages infectant des bactéries d'affinage à partir du fromage, et une publication récente relie leur présence à un impact négatif sur les produits finis (Gautier et al. 1995a; de Melo et al. 2020). Le premier métavirome de la surface d'un fromage à pâte molle et croûte lavée (PMCL) a également été produit récemment (Dugat-Bony et al. 2020), révélant que de nombreux phages sont présents dans cet écosystème et que,

d'après les prédictions d'hôtes réalisées sur la base des séquences obtenues, certains pourraient infecter des bactéries d'affinage.

Ce travail de thèse a pour objectif de fournir des premiers éléments permettant d'explorer le rôle des phages dans l'écosystème fromager au moment de l'affinage. Pour cela, deux approches complémentaires ont été mises en œuvre pour étudier les bactériophages d'un fromage à pâte molle et croûte lavée : une approche culture-dépendante (**Chapitre 2**) et une approche de métagénomique virale (**Chapitre 3**).

Le manuscrit est rédigé sous forme d'une thèse sur articles et est structuré en cinq parties :

La **synthèse bibliographique** a pour objectif de préciser le contexte scientifique de la thèse. Dans la première partie, les connaissances relatives aux productions fromagères sont présentées, avec un focus particulier sur la famille technologique de fromage qui a été étudiée dans le volet expérimental de la thèse : les fromages à pâtes molles et croûtes lavées. Les caractéristiques des communautés microbiennes qui sont associées aux fromages sont développées dans la seconde partie, en mettant encore une fois l'accent sur les fromages PMCL. La troisième partie est consacrée aux bactériophages et s'attache à présenter leurs cycles de vie, leurs impacts dans l'industrie laitière, et les méthodes disponibles pour leur étude. La quatrième et dernière partie porte sur l'écologie microbienne du fromage et s'attache à décrire l'effet des principaux facteurs abiotiques et biotiques sur le fonctionnement de cet écosystème.

Le **Chapitre 1** traite, sous forme de revue scientifique, de l'écologie des bactériophages dans les aliments fermentés. Leur inventaire dans plusieurs types d'aliments fermentés est dressé, et leurs rôles écologiques potentiels dans ce type d'écosystème particulier sont questionnés sur la base des connaissances générées sur d'autres écosystèmes naturels mieux décrits.

Le **Chapitre 2** détaille, sous la forme d'un article de recherche, la première partie du travail expérimental de la thèse. Il décrit l'isolement et la caractérisation de plusieurs phages virulents à partir de la surface d'un fromage de type PMCL, ainsi que leur détection dans différents réservoirs de production.

Le **Chapitre 3** présente, sous la forme d'une ébauche d'article de recherche, l'application de l'approche de métagénomique virale pour étudier la dynamique des populations de phages

en surface d'un fromage PMCL au cours de l'affinage, et la persistance de la communauté virale du même type de fromage sur une période couvrant plusieurs années de production.

La **discussion générale** synthétise les principaux résultats de la thèse et les replace dans leur contexte pour formuler des perspectives de recherche nécessaires pour aller plus loin dans la compréhension du rôle des bactériophages dans l'écosystème microbien fromager et l'exploitation de ces connaissances pour mieux maîtriser le procédé de fabrication du fromage.

Synthèse bibliographique

Partie I – Le fromage : un aliment ancien et ultramoderne

Le fromage est un aliment fermenté dont la fabrication, et plus encore la consommation sont répandues à travers le monde (Fox et McSweeney 2017). A l'origine, la transformation du lait en fromage était un moyen de conserver et de faciliter le transport du lait, qui est microbiologiquement instable, puisqu'il contient naturellement des microorganismes et les ressources essentielles à leur multiplication.

1. Définition : Qu'est-ce qu'un fromage ?

Chaque pays possède sa propre définition du fromage (Hickey 2017). En France, l'utilisation de la dénomination « fromage » « [...] est réservée au produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir des matières d'origine exclusivement laitière suivantes : lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse, babeurre, utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse. La dénomination "fromage" peut également être utilisée pour tout produit issu de fromages [...], par mélange ou assemblage entre eux ou avec des matières premières laitières [...], pour autant que ce produit n'incorpore pas d'autres ingrédients que ceux qui sont autorisés dans ces fromages [...]. La teneur minimale en matière sèche du produit ainsi défini doit être de 23 grammes pour 100 grammes de fromage » (*Décret n°2007-628 du 27 avril 2007 relatif aux fromages et spécialités fromagères 2007*).

Une définition plus internationale est donnée par le Codex Alimentarius (traduit de l'anglais) : « Le fromage est le produit, affiné ou non, mou, semi-dur, dur ou extra dur, pouvant être enrobé, et dans lequel le ratio protéine/caséine du lactosérum n'excède pas celui du lait, obtenu par : (a) coagulation, totale ou partielle de la protéine du lait, lait écrémé, lait partiellement écrémé, de la crème, crème de lactosérum, du babeurre, ou toute combinaison de ces matières, grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulants, et par l'égouttage partiel du lactosérum issu de la coagulation, tout en respectant le principe que la fabrication fromagère entraîne la concentration des protéines du lait (en particulier la fraction caséique), et que par conséquent, la teneur en protéine du fromage sera significativement plus élevée que celle du mélange des matières laitières citées ci-dessus, à partir desquelles le fromage a été obtenu ; et/ou (b) les techniques de transformation entraînant la coagulation des protéines du lait et/ou des produits obtenus à partir du lait et qui donnent un produit fini possédant des

caractéristiques physiques, chimiques et organoleptiques similaires au produit défini en (a). » (Codex Alimentarius Commission 2007).

Les deux premières définitions ne décrivent pas le fromage comme un aliment étant forcément issu d'un processus fermentaire. Cependant, une dernière définition permet de préciser que dans la plupart des cas, le fromage est un aliment fermenté, c'est-à-dire qu'il est fabriqué grâce à la « croissance souhaitée de microorganismes et aux transformations enzymatiques de ses composants alimentaires » (Marco et al. 2021). Seul le cas particulier des fromages frais obtenus par acidification chimique n'entre pas dans le cadre de cette définition. Les auteurs parlent à ce sujet de « versions chimiquement dérivées d'aliments fermentés ».

2. De l'origine à l'expansion mondiale du fromage

Les premières traces témoignant du stockage et de la transformation du lait en fromage, datant d'environ -6000 av. J.-C., ont récemment été retrouvées en Pologne (Salque et al. 2013) et en Dalmatie (Gross 2018) dans des poteries. Dès lors, le savoir-faire lié à la fabrication du fromage commence son expansion à travers le monde, profitant de l'essor des civilisations (Fox et McSweeney 2017). De nos jours, des fromages sont produits et consommés sur les 5 continents, avec une forte polarisation en Europe (Delfosse 2012). En France, d'après les chiffres de FranceAgriMer (FranceAgriMer 2022), si les quantités de fromage consommées sont irrégulières, son prix de vente moyen suit une évolution positive stable depuis 2016. Environ 830 000 tonnes de fromage ont été vendues en 2021, à un prix moyen de 9,85 €/kg. Les fromages au lait de vache sont largement dominants, puisqu'ils représentent plus de 84% des ventes. C'est d'ailleurs l'emmental qui est la variété de fromage la plus vendue. Viennent ensuite les fromages au lait de chèvre (environ 9%) et de brebis (6%). En termes de diversité, les chiffres varient selon les auteurs. Le nombre de variétés de fromage est estimé à environ 1200 rien qu'en France (d'où le mot célèbre attribué à Charles De Gaulle, « Comment voulez-vous gouverner un pays où il existe 258 variétés de fromage ? »). Cette diversité est étonnamment élevée, au regard du nombre réduit des ingrédients de base (lait, présure, sel).

3. Evolution des pratiques de fabrication : l'exemple des fromages au lait cru

Les fromages que nous connaissons sont le fruit du hasard, de l'empirisme et de la science. Il est d'ailleurs très probable que les premiers fromages aient été obtenus « accidentellement ». En effet, il est possible d'obtenir un gel, appelé « caillé », par l'unique action acidifiante des

bactéries du lait : lorsque ce dernier atteint un pH suffisamment bas, il coagule. De même, le stockage du lait dans la caillette de ruminants fraîchement abattus, aboutit à la formation d'un caillé, cette fois-ci grâce à l'action des enzymes sécrétées par cet organe (Fox et McSweeney 2017).

Depuis plusieurs dizaines d'années, les connaissances théoriques apportées dans des domaines comme la biochimie et la microbiologie ont permis de contrôler de plus en plus finement les transformations liées au processus fromager. La standardisation des méthodes de fabrication et la constitution de cahiers des charges (CDC) ont concouru à une définition plus précise des différentes variétés de fromage (Fox et McSweeney 2017). En particulier, la pasteurisation du lait est devenue quasiment systématique, surtout dans les productions de taille industrielle. Il est estimé que seuls 10% des fromages fabriqués dans l'Union Européenne sont au lait cru (Panthi et al. 2017). En France, la part des fromages au lait cru représente 16% de la production nationale en 2022 (AOP-CNAOL 2022b). Aux Etats-Unis en revanche, il est interdit de vendre des fromages au lait cru affinés moins de 60 jours (FDA 2022). La vente directe de lait cru est interdite dans 20/50 états, et n'est pas autorisée entre-états (Oliver et al. 2009; Nutrition 2022). Ces réglementations s'appuient sur des publications qui démontrent que le lait et le fromage crus peuvent être vecteurs de bactéries pathogènes (Honish et al. 2005; Cremonesi et al. 2007). D'un autre côté, plusieurs études scientifiques montrent que les fromages au lait cru, à stade d'affinage égal, ont une complexité aromatique plus élevée que des fromages au lait pasteurisé (Beuvier et al. 1997; Albenzio et al. 2001; Montel et al. 2014a). Ce résultat est étroitement lié à la plus grande diversité microbienne que ces fromages abritent (Feurer et al. 2004a; Egger et al. 2021). Les fromages au lait pasteurisé n'étant pas pour autant exempts de bactéries pathogènes (Kousta et al. 2010), il faut trouver un équilibre entre sécurité des aliments et satisfaction des consommateurs. La recherche de cet équilibre a un impact direct sur les manières de fabriquer du fromage.

4. La fabrication du fromage

4.1. La matière première : le lait

La dénomination « lait » est réservée exclusivement au « produit de la sécrétion mammaire normale, obtenu par une ou plusieurs traites, sans aucune addition ni soustraction » (Conseil de l'Union Européenne 2007). Chez la vache par exemple, la lactation est conditionnée par sa

gestation, qui dure 9 mois. Elle se poursuit un mois après la parturition, pendant la période d'allaitement. Après 10 mois, elle se tarit, pendant une période d'environ 2 mois (Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire 2019). Le lait a pour fonction d'aider au développement du veau. Trois semaines avant le vêlage, et pendant 6 jours après, la composition du lait change : le colostrum est un lait plus riche en nutriments, ainsi qu'en anticorps. La composition classique du lait de vache en macronutriments est la suivante : 3,8-5,5% de matières grasses, 2,9-3,5% de protéines et 5% de sucres, dont principalement du lactose. Le lait contient également des micronutriments, dont des minéraux comme le calcium et le magnésium, et des vitamines (exemples : B2, B5, B12) (Fox et al. 2015; Foroutan et al. 2019).

Le lait cru correspond au « lait produit par la sécrétion de la glande mammaire d'animaux d'élevage et non chauffé à plus de 40 °C, ni soumis à un traitement d'effet équivalent » (Parlement européen et conseil de l'Union Européenne 2004). Ce lait n'a donc subi aucun traitement autre que la réfrigération mécanique immédiate après la traite à la ferme (Groupe d'étude des marchés de restauration collective et de nutrition 2009). L'espèce animale (vache, chèvre, brebis), mais également sa race (Prim'Holstein, Jersiaise) ont une influence notoire sur la composition du lait cru, par exemple sur les taux butyreux et protéiques (**Tableau I**). Il en va de même pour la saison (Heck et al. 2009), le stade de lactation (Kuchtik et al. 2008), l'alimentation (Sutton 1989; Jenkins et McGuire 2006) et la santé des bêtes, avec en particulier la santé des mamelles qui dépend beaucoup de l'hygiène de traite (Martí De Olives et al. 2013). La composition microbiologique et physico-chimique du lait a une influence directe sur le rendement et la qualité des fromages produits (Pazzola et al. 2019). Il a par exemple été estimé que la production d'enzymes de types lipase et protéase par des bactéries psychrotolérantes serait responsable de la perte de 10% des acides gras et des protéines du lait (Hantsis-Zacharov et Halpern 2007). Cela provoque des défauts organoleptiques dans le lait (comme l'amertume) et des baisses de rendement lors de sa transformation en fromage. A l'inverse, il a été montré qu'un lait avec des taux élevés en protéines et acides gras formait un gel plus ferme, et plus facile à égoutter (Jöudu et al. 2008; Mateo et al. 2009).

Tableau I : Effet de la race sur la composition chimique du lait de vache (adapté de (Panthi et al. 2017)).

Race	Taux butyreux (%)	Taux protéique (%)	Taux de caséine (%)	Taux de lactose (%)
Holstein	3,77 ± 0,32	3,28 ± 0,21	2,57 ± 0,23	4,78 ± 0,19
Jersey	5,43 ± 0,38	3,84 ± 0,12	2,96 ± 0,17	4,55 ± 0,50
Montbéliarde	3,67 ± 0,22	3,26 ± 0,04	2,63 ± 0,02	4,81 ± 0,13
Brune	3,85 ± 0,27	3,49 ± 0,27	2,77 ± 0,29	4,98 ± 0,06
Tarentaise	3,64 ± 0,38	3,21 ± 0,01	2,61	4,92
Normande	3,81	3,49	2,77	4,73

4.2. Le procédé général de fabrication du fromage

Après la traite et la collecte, le lait cru est soit directement mis en fabrication, soit réfrigéré et stocké à 4 °C, pendant parfois plusieurs jours. Au début de la fabrication, le lait est généralement pasteurisé, puis inoculé avec des ferments lactiques. Ces derniers doivent permettre une acidification contrôlée du lait, qui est plus ou moins rapide selon la variété de fromage fabriquée. Le pH recherché en fin d'acidification est généralement compris entre 4,6 et 5,1 (Fox et McSweeney 2017). Globalement, deux facteurs concourent à faire coaguler le lait, selon des mécanismes différents :

- L'acidification du lait a pour effet de réduire les charges de surface des caséines à l'approche de leur point isoélectrique (pH 4,6), ce qui déstabilise les micelles. Cela conduit à l'agrégation des caséines, qui représentent environ 80% des protéines du lait, et à la formation d'un gel (Lucey 2017).
- L'utilisation de présure, classiquement extraite de la caillette de jeunes ruminants, doit son action à deux enzymes, la chymosine et la pepsine, dont les proportions varient en fonction de l'âge et de l'alimentation de l'animal (Guilloteau et al. 1984; Jaros et Rohm 2017). La chymosine est capable d'hydrolyser spécifiquement les liaisons peptidiques Phe₁₀₅-Met₁₀₆ des caséines kappa, ce qui provoque l'agrégation des autres types de caséines (alpha et bêta) et la formation d'un gel. La pepsine joue un rôle similaire mais son action est moins spécifique, puisqu'elle peut cliver des liaisons avec des résidus leucine, phénylalanine, tyrosine ou valine (Agudelo et al. 2004).

Les deux méthodes sont en général utilisées conjointement en production fromagère. Cependant, la fabrication de certains fromages repose davantage sur la coagulation liée à l'acidification du lait, ce qui donne des caillés dits « lactiques ». Il s'agit par exemple des fromages de type Camembert ou Epoisses. A l'inverse, si la coagulation est majoritairement due à l'action des enzymes de la présure, un caillé dit « présure » est obtenu. C'est par exemple le cas du Gruyère ou du Comté.

Une fois le caillé produit, suit l'étape d'égouttage, dont l'objectif est d'éliminer une partie de l'eau piégée dans le caillé. Cette dernière peut s'écouler naturellement, ou après tranchage, agitation ou encore pressage, sous forme de lactosérum, également appelé petit-lait. En général, la synérèse, c'est-à-dire la séparation de l'eau à partir d'un gel, s'opère mieux dans les caillés présure, ce qui permet d'obtenir des gels plus fermes (Fox et McSweeney 2017). Il est possible de récupérer le lactosérum, qui peut retenir une quantité de protéines non-négligeable, afin de le réincorporer dans une future production, et ainsi maximiser les rendements (Hinrichs 2001; Masotti et al. 2017).

Ensuite, le fromage est moulé pour lui donner sa forme finale puis salé. Le salage peut s'opérer principalement de trois manières :

- En utilisant du sel sec, qui est mixé avec le caillé, comme dans le cas du Cheddar par exemple.
- En frottant manuellement du sel sec à la surface du fromage. Cette technique est par exemple utilisée dans la fabrication du camembert et de l'Epoisses.
- En immergeant le fromage dans une solution d'eau salée, la saumure. C'est par exemple le cas pour le Gouda et la Mozzarella. Une même saumure peut être réutilisée au cours de plusieurs productions successives, ce qui fait évoluer sa composition microbiologique et chimique au cours du temps (Irlinger et al. 2017).

Pour un certain nombre de variétés, appartenant à la catégorie des fromages frais, le procédé de fabrication s'arrête à ce stade (**Figure 1**). Pour les autres débute la période d'affinage qui s'opère à basse température, généralement entre 12 et 15 °C, et en présence d'une forte humidité relative, généralement $\geq 80\%$. L'affinage peut durer de quelques semaines à plusieurs années en fonction du type de fromage considéré et être ponctué par l'application de différents types de soins, à des fréquences variables :

- Le piquage : cette technique est utilisée pour permettre le développement du champignon filamenteux *Penicillium roqueforti* dans les fromages à pâtes persillées. Elle consiste à transpercer le fromage avec de fines aiguilles pour créer des zones oxygénées à l'intérieur, condition nécessaire à la croissance du champignon.
- Les lavages ou frottages : les frottages, manuels ou mécaniques, permettent de casser les mycéliums qui se développent sur les fromages à croûtes fleuries. Les fromages à croûtes lavées sont humidifiés à la main ou à l'aide d'un torchon, avec une solution aqueuse qui peut contenir du sel et des ferments d'affinage. Pour certaines variétés, d'autres ingrédients sont ajoutés aux soins comme de l'alcool par exemple, sous la forme de bières, vins, liqueurs ou d'eaux de vie. Le lavage permet une répartition homogène des ferments à la surface de la croûte.
- Les retournements : cette pratique permet d'exposer une face du fromage à l'air, et de la rendre plus accessible pour un autre soin (lavage par exemple).

L'ajout de ferments d'affinage directement dans le lait en début de fabrication, ou dans les solutions de soins au moment de l'affinage constitue une pratique répandue chez les producteurs de fromages. Cet ensemencement dirigé a pour objectif d'aider les fromagers à mieux maîtriser cette étape majeure de la fabrication, en favorisant le développement de certaines populations microbiennes. En effet, c'est au cours de l'affinage que se développent les principales caractéristiques organoleptiques des fromages dits « affinés », dont leur texture, leur couleur, leurs arômes et leurs saveurs, qui donnent leur typicité aux différentes variétés de fromage. Ces caractéristiques sont principalement liées aux activités métaboliques des microorganismes qui se développent dans le cœur et sur la croûte du fromage. Parmi elles, il convient de relever :

- Le métabolisme du lactose résiduel et du lactate. La dégradation du lactose produit du lactate, qui apporte une saveur particulière au produit. Le lactate est lui-même précurseur de la production de propionate, d'acétate, d'H₂O et de CO₂ par *Propionibacterium freudenreichii*, en anaérobie. Le CO₂ dégagé est responsable de la formation des « yeux » dans les fromages de type Emmental, et le propionate de sa saveur. En revanche, il peut aussi être transformé, toujours en conditions anaérobies, en butyrate, CO₂ et H₂ par *Clostridium tyrobutyricum*. L'accumulation de dihydrogène

et de dioxyde de carbone dans le coeur provoque alors le gonflement tardif et non-désiré des fromages à pâtes dures (McSweeney et Sousa 2000).

- La lipolyse, qui produit des acides gras libres par l'action des lipases. Ces derniers constituent des précurseurs pour la formation d'autres composés volatils comme des esters, des thioesters et des lactones qui contribuent aux arômes des fromages (McSweeney 2017).
- La protéolyse, qui produit des peptides et des acides aminés libres, par l'action de protéases et de peptidases d'origine microbienne. Elle a un impact majeur sur la structure du fromage. Par ailleurs, le catabolisme des acides aminés produit de nombreuses molécules d'arômes (Yvon et Rijnen 2001; Thierry et Maillard 2002).
- La production de pigments intervient principalement pendant l'affinage. Elle est liée au métabolisme de bactéries et de champignons. Par exemple, la bactérie *Glutamicibacter arilaitensis* est connue pour produire des pigments caroténoïdes jaunes (Giuffrida et al. 2016) et rouges (Sutthiwong et al. 2021). De même, il a été montré que *Brevibacterium aurantiacum* est capable de synthétiser un pigment carmin au contact d'un composé alcalin (Galaup et al. 2015a). Chez les champignons filamenteux, *Penicillium roqueforti* donne les veines bleues du Roquefort par exemple (Cleere 2017).

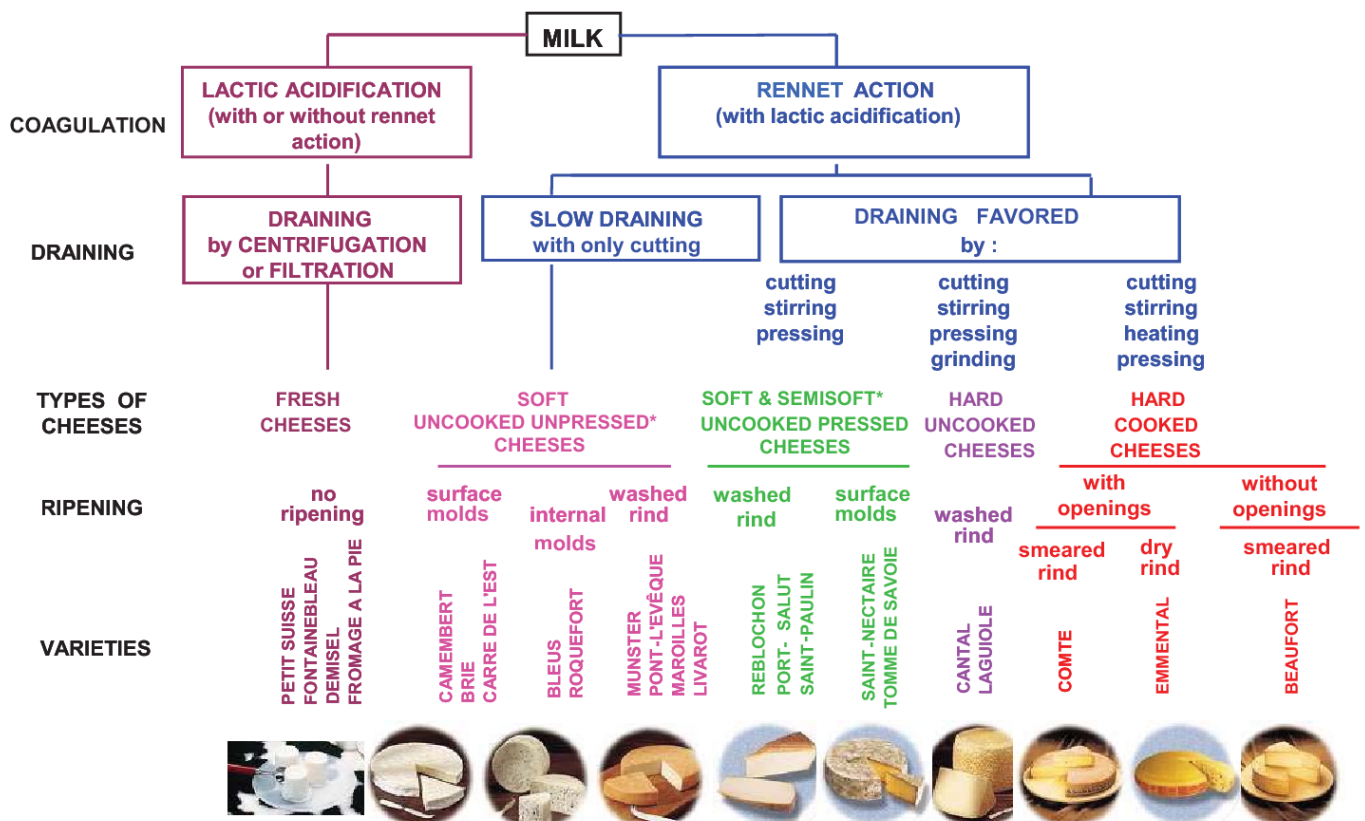


Figure 1 : Etapes clés de fabrication des principales variétés de fromages français (d'après (Almena-Aliste et Mietton 2014)).

4.3. Le cas particulier des fromages à pâte molle et croûte lavée (PMCL)

Les pâtes molles à croûte lavée (ou croûte morgée, la morgé étant synonyme de solution de soin) sont des fromages à la croûte rouge-orangée, brillante, humide et collante, caractérisés par une odeur puissante et le développement en surface de communautés microbiennes spécifiques au cours de l'affinage.

En France, plusieurs types de fromages PMCL sont produits, dont l'Époisses, le Livarot, le Maroilles, le Munster, le Langres ou encore le Pont-l'Évêque. Une partie de la production de ces fromages au lait de vache est reconnue par une appellation d'origine protégée (AOP, cf 5.).

4.3.1. Caractéristiques générales

La couleur caractéristique des fromages PMCL est liée à la production de pigments par certaines bactéries de surface, appartenant notamment aux genres *Brevibacterium*, *Glutamicibacter*, *Micrococcus* et *Staphylococcus* (Galaup et al. 2005). Dans certains cahiers des charges, l'ajout de colorants naturels, comme le rocou, aussi appelé « annatto » (colorant alimentaire E160b), est autorisé (Desmasures et al. 2015).

Les arômes typiques de ce type de fromage sont issus de la production de composés volatils, en particulier les composés soufrés (Landaud et al. 2008). Par exemple, le goût piquant est dû à la transformation des acides aminés soufrés tels que la méthionine et la cystéine (del Castillo-Lozano et al. 2008). Cette réaction aboutit à la production d'autres composés soufrés dont le méthane-thiol et les diméthyle tri- et disulphide (Varming et al. 2013). Le méthane-thiol est responsable de l'odeur de type « chou, ail » associée à ces fromages. Les cahiers des charges recensent les descripteurs organoleptiques typiques de chaque AOP. Les caractéristiques décrites sont principalement acquises au cours de l'affinage.

4.3.2. L'affinage des fromages PMCL

Cette partie se concentre sur les 6 fromages PMCL français, reconnus par une AOP, en s'appuyant sur leur cahier des charges respectifs. A chaque variété est associée une aire géographique, comprenant un ou plusieurs départements (exemple : Calvados, Orne et Eure

pour le Livarot). De même, seules certaines races de vaches sont autorisées pour la collecte et la transformation du lait (exemple : race Normande pour le Livarot) (INAO 2014a).

Concernant la fabrication, seul l'Epoisses repose sur une coagulation à dominante lactique, associée à un égouttage spontané et un salage au sel sec. Les autres variétés reposent sur l'utilisation de présure animale pour l'obtention du caillé, avec un salage au sel sec ou par saumurage (INAO 2010).

A partir de là, les conditions d'affinage de ces fromages sont assez similaires. En général, l'ambiance des salles d'affinage est très humide : au moins 90% d'humidité relative (HR) sont requis, sauf pour le Langres (HR \geq 80%) (INAO 2009).

Au niveau des températures, certaines particularités apparaissent :

- Epoisses : non précisé (INAO 2010).
- Livarot : [10 ; 14] °C en hâloir, puis [6 ; 9] °C si un affinage complémentaire est réalisé après emballage (INAO 2014a).
- Maroilles : [9 ; 16] °C (INAO 2015a).
- Munster : >16 °C pendant la phase de levuration ; [10 ; 16] °C pendant la phase de traitement humide (INAO 2017).
- Langres : [6 ; 14] °C (INAO 2009).
- Pont-l'Évêque : [11 ; 19] °C (INAO 2015b).

Concernant les soins, les textes précisent leur fréquence et leur nature. Ainsi, le Livarot doit subir au moins 3 lavages. Les fromages PMCL décrits peuvent être brossés, frottés, et lavés avec une solution salée. Cette dernière peut contenir des ferments, comme *Brevibacterium linens* dans le cas du Maroilles, ou de l'alcool, comme du Marc de Bourgogne pour l'Epoisses. L'ajout de colorants est interdit, sauf pour le Livarot et le Langres pour lesquels l'utilisation de rocou est autorisée.

Enfin, les durées d'affinage varient en fonction des formats produits. En effet, pour les petits formats, le temps d'affinage minimum requis est plus court que pour les grands. En ne considérant que les formats les plus volumineux, les temps d'affinage durent entre 21 jours pour le Munster, le Langres et le Pont-l'Évêque, et 35 jours pour le Livarot et le Maroilles. L'Epoisses se situe entre les deux avec un minimum de 4 semaines d'affinage.

Ainsi, le respect du CDC associé à chaque AOP est un gage de la qualité et de l'authenticité du produit pour le consommateur.

5. Les signes de qualité

A l'instar du vin, il est difficile de parler de fromage sans parler des signes de qualité qui leur sont associés. Il existe quatre signes de qualité reconnus au niveau européen : les appellations d'origines protégées (AOP), les indications géographiques protégées (IGP), les spécialités traditionnelles garanties (STG), et enfin les produits issus de l'agriculture biologique (AB) (DGCCRF 2021). Chaque signe garantit au consommateur un ou plusieurs aspects relatifs au produit. L'obtention d'un signe de qualité passe par le respect d'un CDC, proposé par le demandeur. L'institut national de l'origine et de la qualité (INAO) a pour rôle de vérifier si ce CDC est conforme. Enfin, c'est à un organisme de contrôle agréé par l'INAO, qu'il revient de certifier ou non un produit.

L'appellation d'origine contrôlée (AOC) a été créée en France en 1935, pour lutter contre les fraudes. Elle concernait initialement le vin et l'eau-de-vie, avant de couvrir tous les produits agricoles et alimentaires dès 1990. L'AOP, qui est l'équivalent européen de l'AOC, voit le jour en 1992. Depuis 2012, les produits concernés doivent porter la mention AOP (à l'exception des vins qui peuvent continuer à afficher la version française du signe). Une AOP protège un savoir-faire reconnu, en association avec un terroir : en effet, toutes les étapes de production doivent être réalisées au sein de la même aire géographique (INAO 2020a).

L'IGP a été mise en place en 1992. Comme l'AOP, elle met en relation la qualité et l'origine géographique d'un produit. Elle est en revanche moins exigeante au niveau de l'origine, puisqu'il suffit qu'au moins une étape parmi « la production, la transformation ou l'élaboration de ce produit [ait] lieu dans cette aire géographique délimitée » (INAO 2020b).

La STG voit également le jour en 1992. Elle reconnaît « un produit dont les qualités spécifiques sont liées à une composition, des méthodes de fabrication ou de transformation fondées sur une tradition ». A l'inverse des deux signes précédents, elle ne garantit pas d'origine géographique particulière (INAO 2020d).

Le Label Rouge est un signe homologué depuis 1965 et exclusivement délivré par les autorités françaises. Il reconnaît qu'un produit se distingue des produits similaires disponibles sur le

marché par sa qualité supérieure, qui comprend : les conditions de production, l'image du produit, les éléments de présentation et les caractéristiques sensorielles (INAO 2020c).

Le logo AB valorise les produits dont le mode de production est respectueux de l'environnement et du bien-être animal. Il existe depuis 1985 (INAO 2022).

En France, sont commercialisés :

- 46 fromages qui bénéficiaient d'une AOP en 2021, et représentaient 25% des fabrications totales (AOP-CNAOL 2022a). Pour une grande part des AOP (28/46), l'utilisation de lait cru est obligatoire, comme pour le Valencay ou le Camembert de Normandie (INAO 2013; INAO 2014b). La **Figure 2** représente les 46 AOP fromagères ainsi que leur provenance.
- 9 fromages qui bénéficiaient d'une IGP en 2020 (AOP-CNAOL 2022a).
- 1 spécialité savoyarde à base de fromage, le Berthoud, bénéficie depuis peu du label STG (Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire 2020).
- Récemment, quelques fromages se sont également vu attribuer le signe Label Rouge, qui peut être cumulé avec une IGP ou une STG, mais pas avec une AOP. Cela concerne par exemple le fromage à raclette, l'emmental, le Brie, le Cabécou et la faisselle.

De plus en plus de fromages, en particulier de fromages frais, portent la mention « bio », qui peut venir en complément d'un autre signe de qualité (FranceAgriMer 2016). Il existe également des mentions valorisantes (DGCCRF 2021), telles que « fermier » ou « laitier », associées à certains produits, dont le Saint-Nectaire par exemple. La mention « fermier » indique que le fromage est fabriqué par un producteur utilisant uniquement le lait de son exploitation (article 9-1, (Légifrance 2015)).



Figure 2 : Carte de France des 46 fromages bénéficiant d'une AOP (d'après (AOP-CNAOL 2022a)).

Finalement, la typicité des arômes d'un fromage repose sur la transformation d'une matière première (dont les caractéristiques dépendent elles-même de l'animal et de son alimentation) par un savoir-faire, parfois associé à une aire géographique plus ou moins étendue. L'ensemble de ces éléments sont étroitement liés et influent sur le microbiote du fromage.

Partie II – Le microbiote du fromage : une communauté contrôlée

A l'intérieur et en surface du fromage, se développent de nombreuses bactéries, appartenant principalement aux phyla des *Bacillota*, *Actinobacteria*, *Pseudomonadota*, et *Bacteroidota*, des levures et des champignons filamenteux (Irlinger et al. 2015a). Ces microorganismes forment la communauté microbienne, ou microbiote, du fromage. Si les pratiques de fabrication restent identiques, il a été montré que les communautés microbiennes du cœur et de la surface du fromage ont tendance à être stables. Cela a par exemple été observé suite à l'analyse de fromages canadiens affinés dont les productions étaient espacées de 3 années (Raymond-Fleury et al. 2022). Le contrôle des communautés microbiennes étant déterminant pour la fabrication d'un produit de qualité, ce résultat est rassurant du point de vue des producteurs. Finalement, la composition du microbiote dépend de la variété de fromage considérée et est même souvent caractéristique de l'unité de production (Wolfe et al. 2014; Dugat-Bony et al. 2016a).

1. Les microorganismes du fromage

1.1. Les bactéries lactiques : SLAB et NSLAB (starter et non-starter lactic acid bacteria)

Les bactéries lactiques (LAB) sont des bactéries à Gram positif appartenant au phylum des *Bacillota*, à la classe des *Bacilli* et à l'ordre des *Lactobacillales* (Holzapfel et Wood 2014). Elles comprennent actuellement 5 familles, les *Leuconostocaceae* ayant récemment fusionné avec les *Lactobacillaceae* (Zheng et al. 2020). Elles sont essentielles à la fabrication de nombreux aliments fermentés, de par leurs propriétés acidifiantes.

En fabrication fromagère en particulier, elles sont principalement utilisées pour leur capacité à fermenter le lactose et à produire de l'acide lactique. Selon les produits de cette réaction, les LAB sont classées selon différents types fermentaires (**Figure 3**):

- homofermentaires, c'est-à-dire que le produit principal de la dégradation du lactose est l'acide lactique. C'est le cas de *Lactococcus lactis* ou *Streptococcus thermophilus*.
- hétérofermentaires, c'est-à-dire qu'en plus de l'acide lactique, il y a formation de co-produits comme du CO₂, de l'éthanol ou de l'acide acétique. C'est par exemple le cas de *L. brevis* ou *Leuconostoc mesenteroides* en conditions micro-aérophiles (Bintsis et Bintsis 2018).

Il existe enfin des LAB qualifiées d'hétérofermentaires facultatives, capables d'utiliser la voie des pentoses phosphate ou la glycolyse suivant les conditions environnementales (sucres disponibles) dans lesquelles elles se trouvent. Cela concerne par exemple *Lactocaseibacillus casei* et *Lactiplantibacillus plantarum*.

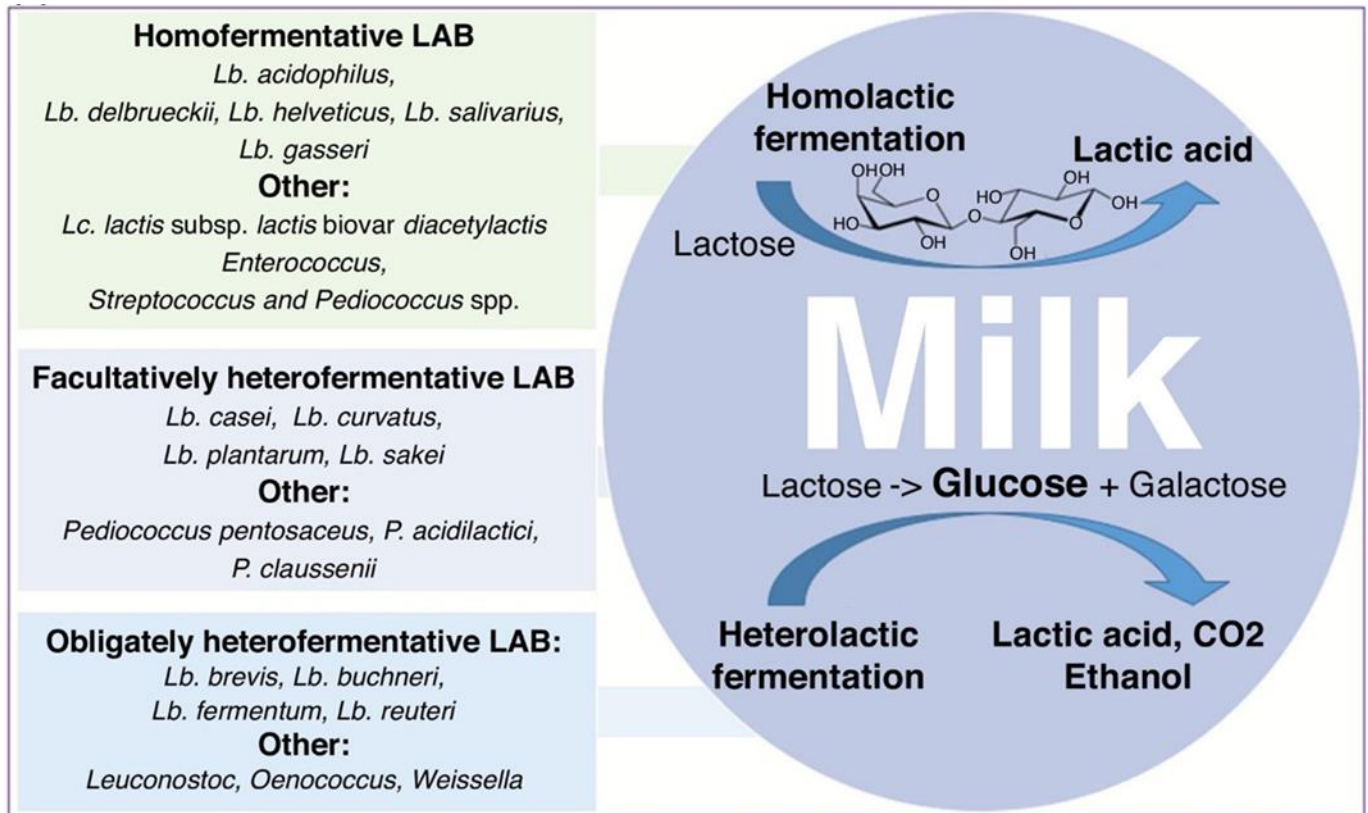


Figure 3 : Métabolisme du lactose par les bactéries lactiques du lait (d'après (Macori et Cotter 2018)).

Il est également possible de classer les LAB en fonction de leur température de croissance :

- les mésophiles, dont l'optimum de croissance se situe entre 20 et 45 °C. C'est le cas de *Leuconostoc* spp. et de *Lactococcus lactis* par exemple (Cotter et Beresford 2017).
- les thermophiles, qui se développent à des températures supérieures à 45 °C. *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, et *L. helveticus* font partie de cette catégorie.

Les LAB acidifiantes typiques du cœur du fromage appartiennent principalement aux genres *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Streptococcus* (Yeluri Jonnala et al. 2018; Coelho et al. 2022). Bien que leur rôle technologique majeur intervienne plutôt en début de fermentation, elles sont aussi capables d'apporter une plus-value lors de l'affinage, à travers la production de divers

métabolites qui impactent les propriétés sensorielles du produit (**Figure 4**). Par exemple, l'autolyse de certaines LAB, dont *Lactococcus lactis* (Steele et al. 2013), permet de réduire l'amertume et de produire des composés aromatiques désirables dans le fromage comme le benzaldéhyde et des composés soufrés (Lortal et Chapot-Chartier 2005).

Parmi les LAB, certaines espèces se développent plus tardivement, durant la période d'affinage du fromage. Ces espèces, qualifiées de NSLAB, sont très nombreuses et appartiennent principalement à la famille des *Lactobacillaceae* (Gobbetti et al. 2015) ou aux genres *Pediococcus*, *Enterococcus*, et *Leuconostoc* (Coelho et al. 2022). Les *Leuconostoc*, par exemple *L. mesenteroides* et *L. pseudomesenteroides*, entrent dans la composition de certains ferments d'affinage indéfinis (Frantzen et al. 2017). Leur ensemencement dirigé s'explique notamment par leur capacité à produire du CO₂. Cette propriété est exploitée pour créer des ouvertures dans le fromage, ce qui est intéressant dans certaines technologies fromagères (les bleus par exemple). Elles ont également un intérêt organoleptique reconnu, car elles sont capables de produire du diacétyle, une molécule qui présente des notes « beurre », par la fermentation de l'acide citrique (Kleppen et al. 2012).

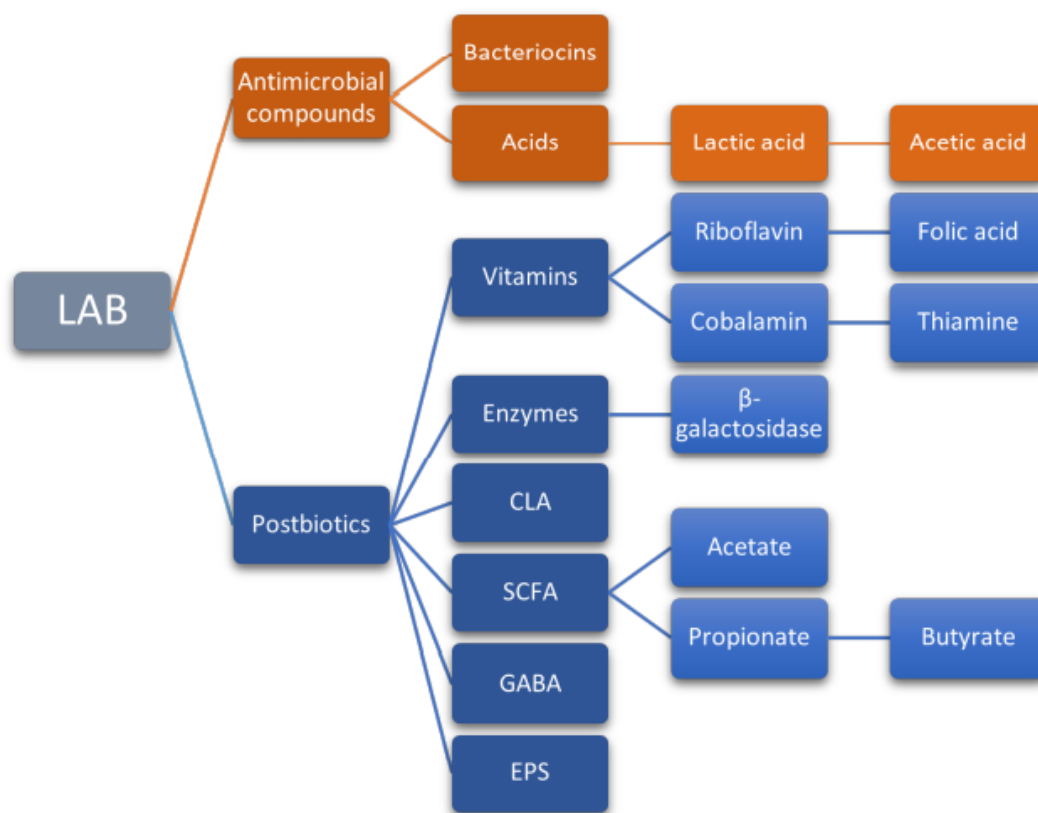


Figure 4 : Production de métabolites par des LAB (d'après (Coelho et al. 2022)).

1.2. Les autres bactéries

1.2.1. Les bactéries d'affinage de surface

Les bactéries de surface commencent généralement à se développer quelques jours après le début de l'affinage, lorsque les conditions, et plus particulièrement le pH, deviennent propices à leur croissance. Elles occupent une place importante dans cette dernière étape de la fabrication, et ont deux origines principales :

- l'environnement de production, qui est colonisé par des bactéries appartenant aux phyla des *Actinobacteria*, des *Bacillota* et des *Pseudomonadota*. Au sein de ce dernier groupe se trouvent *Hafnia alvei*, qui a récemment été testée pour entrer dans la composition de ferments d'affinage (Merchán et al. 2022), *Psychrobacter*, *Pseudoalteromonas* et *Halomonas*. Par exemple, l'espèce *Psychrobacter aquimaris* est bien adaptée aux conditions d'affinage des fromages à croûte lavée puisqu'elle est psychrophile et halotolérante (Yoon et al. 2005).
- l'ensemencement dirigé de ferments d'affinage. Le choix des bactéries qui composent les ferments repose sur plusieurs critères. Tout d'abord, leur potentiel aromatique, c'est-à-dire leur capacité à produire des molécules d'intérêt organoleptique qui résultent de leurs activités lipolytique, protéolytique et autolytique, entre en compte. Ensuite, leur activité texturante, c'est-à-dire leur capacité à modifier la fermeté du fromage. Le cœur est souvent très ferme en début d'affinage, et s'assouplit progressivement sous l'effet de l'activité protéolytique des microorganismes. Enfin, l'impact des bactéries sur la couleur, qui résulte de la production de pigments.

Les bactéries sélectionnées pour ces propriétés appartiennent souvent au phylum des *Actinobacteria*, et étaient anciennement appelées « bactéries corynéformes » (étymologiquement, « en forme de massue ») (Bockelmann et Hoppe-Seyler 2001). Une grande variété d'espèces, appartenant principalement aux genres *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Glutamicibacter* et *Microbacterium*, sont utilisées (Fox et al. 2017b; Irlinger et al. 2017). Par exemple, *Brevibacterium aurantiacum* et *B. linens* sontensemencées dans plusieurs variétés de fromages à croûte lavée pour leurs propriétés colorantes, dues à la production de pigments caroténoïdes orange (Galaup et al. 2015b). Ces espèces produisent également des composés soufrés caractéristiques de l'arôme de ces

fromages (Arfi et al. 2006). Certaines espèces appartenant anciennement à *Arthrobacter* ont été reclassées dans le genre *Glutamicibacter* (Busse 2016).

Même si les bactéries qui assurent l'affinage se développent généralement en surface, certaines espèces se développent préférentiellement dans le cœur en conditions anaérobies, comme *Propionibacterium freudenreichii* qui joue un rôle majeur dans l'affinage des fromages à pâte dure de type Emmental et Comté (cf **Partie I**) (Chamba et Perreard 2002; Fröhlich-Wyder et al. 2017).

1.2.2. Les bactéries d'altération et les pathogènes

Si les bactéries ci-dessus sont désirables, il existe de nombreuses bactéries qui peuvent causer des défauts visuels et/ou organoleptiques au produit final (bactéries d'altération), voire le rendre impropre à la consommation (bactéries pathogènes). Concernant les défauts visuels par exemple, un développement important de *Clostridium tyrobutyricum* a pour effet bien connu de provoquer le gonflement tardif de certains fromages à pâte dure, ce qui peut entraîner l'éclatement des meules) (Klijn et al. 1995). Dans la même catégorie, *Pseudomonas fluorescens*, a été identifiée comme responsable d'un défaut de coloration bleue sur des Queso Fresco, qui est due à la production de leucoindigoïdine (Martin et al. 2011; del Olmo et al. 2018). Dans le cas de *Thermus thermophilus*, qui produit un caroténoïde, le défaut de coloration est rose et pose problème sur de nombreux fromages partout à travers le monde (Quigley et al. 2016). Enfin, le développement de bactéries d'intérêt technologique dans une variété de fromage donnée peut être indésirable dans d'autres, surtout si leur croissance est mal maîtrisée. Il a par exemple été montré, dans une étude comparative entre des fromages de type Fontina, un fromage à croûte lavée italien, présentant ou non un défaut de coloration « rouge-brune » réalisée par une approche de métagénomique ciblée, qu'un développement trop important de bactéries appartenant aux genres *Corynebacterium* et *Microbacterium* pouvait être associé à l'apparition du défaut (Guzzon et al. 2017). Le développement de certaines bactéries peut aussi produire des goûts/arômes indésirables. C'est le cas de *Pseudomonas fluorescens* et *P. putrefaciens*, qui produisent des peptides amers via leur activité protéolytique (Lemieux et Simard 1991) ou de *B. linens* lorsque la production de composés volatils soufrés est trop importante, ces molécules ayant un seuil de détection très bas (Sablé et Cottenceau 1999).

Enfin la texture du Gouda peut pâtir de l'activité métabolique des bactéries propioniques, qui forment des ouvertures indésirables liées à leur production de CO₂ (Düsterhöft et al. 2017).

Par ailleurs, le fromage est un aliment qui peut accumuler de hautes concentrations en amines biogènes (ex : tyramine, histamine, cadavérine et putrescine), auxquelles certains consommateurs peuvent être sensibles et qui développent des réactions pseudo-allergiques (Loizzo et al. 2013). Les bactéries de la famille des *Enterococcaceae*, comme *Enterococcus faecium*, *E. durans* et *E. faecalis* qui produisent de la tyramine, sont souvent associées à ce type de problème (Marino et al. 2000; Fernández et al. 2007).

Les bactéries pathogènes telles que *Salmonella* spp. (Colak et al. 2007), *Listeria monocytogenes* (Rudolf et Scherer 2001), *Escherichia coli* O157:H7 (Honish et al. 2005; Espié et al. 2006) et *Staphylococcus aureus* (Cremonesi et al. 2007) sont encore occasionnellement retrouvées dans des fromages, au lait cru ou non. Entre 2006 et 2015, par exemple, des fromages contaminés par des *Salmonella* ont été la cause de 58 toxi-infections alimentaires (ANSES 2018).

Pour limiter au maximum ce type de problème, les producteurs de fromages sont tenus de respecter les critères microbiologiques recensés par le règlement n°2073/2005, modifié par le règlement n°1441/2007 (Commission de l'Union Européenne 2005). Par exemple, dans les fromages au lait cru, les microorganismes ci-dessous sont systématiquement contrôlés, avec des seuils à ne pas dépasser :

- *Escherichia coli* (moins de 10⁵ UFC/g pour les croûtes lavées)
- *E. coli* STEC (non détectée dans 25 g)
- Staphylocoques à coagulase positive (moins de 10⁵ UFC/g à la réception)
- Enterotoxine (recherche si staphylocoques > 10⁵ UFC/g)
- *Salmonella* (non détectée dans 25 g)
- *Listeria monocytogenes* (non détectée dans 25 g)

1.3. Les levures et les champignons filamenteux

De la même manière que pour les bactéries d'affinage, le développement et l'activité métabolique des levures et des champignons filamenteux interviennent plutôt au moment de l'affinage. Ils se traduisent par la désacidification du caillé suite à la consommation de l'acide lactique, et les activités de protéolyse et de lipolyse qui mènent à la production de précurseurs

d'arômes. La coloration apportée par certaines espèces est également recherchée dans certaines technologies fromagères.

Sur la base de 33 publications, il ressort que les genres de levures les plus fréquemment détectés à la surface des fromages sont *Debaryomyces*, *Yarrowia*, *Galactomyces*, *Kluyveromyces*, et *Pichia* (Irlinger et al. 2015a). La forte prévalence de *Debaryomyces hansenii* et *Galactomyces geotrichum* s'explique par leur ensemencement dirigé dans de nombreuses variétés de fromage, notamment des fromages à croûtes lavées et fleuries. Il a été montré que *D. hansenii* est capable de produire des arômes d'intérêt en technologie fromagère (acides volatils, arômes de fromage, arômes d'alcool) (Arfi et al. 2002). L'analyse du profil aromatique d'un caillé modèle désacidifié par *D. hansenii* a révélé des arômes floraux (rose fanée, très caractéristique de cette levure) et fruités (méthylcétone) (Leclercq-Perlat et al. 2004). *Kluyveromyces marxianus* et *K. lactis* entrent également dans la composition de certains ferments industriels (Seiler et Busse 1990), et sont souvent retrouvées en surface et dans le cœur des fromages (Fröhlich-Wyder et al. 2019).

Pour les champignons filamenteux, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Scopulariopsis* sont des exemples de genres souvent retrouvés dans le fromage (Irlinger et al. 2015a). D'un point de vue technologique, les champignons filamenteux sont attendus dans le cas particulier des croûtes fleuries, des croûtes naturelles, et des pâtes persillées :

- *P. camemberti* donne son aspect blanc et duveteux à la croûte du Camembert (croûte fleurie) (Lessard et al. 2014).
- Certaines espèces de *Mucor*, *Trichothecium roseum* et *Bifusarium domesticum* donnent son aspect caractéristique au Saint-Nectaire (croûte naturelle, généralement grisâtre) (Marcellino et Benson 2014; Metin 2018).
- Au cœur des pâtes persillées, c'est *P. roqueforti* qui produit des spores bleu-vert (Gillot et al. 2017).

Comme chez les bactéries, un champignon d'intérêt technologique dans un cas peut être indésirable dans un autre contexte de production. Les champignons sont d'ailleurs considérés comme une des sources d'altération les plus courantes du fromage (Cheong et al. 2014). Ainsi, certaines espèces de *Mucor*, qui sont désirées dans les variétés de fromage à croûte naturelle, comme le Saint-Nectaire ou la tomme de Savoie, sont redoutées dans les productions de

fromages à croûte fleurie, comme le Camembert, où elles provoquent l'accident du « poil de chat » (Garnier et al. 2017a). Du côté des levures, un développement trop important de *Galactomyces geotrichum* provoque le défaut de la « peau de crapaud » sur le Camembert (McSweeney 2007; Garnier et al. 2017b).

1.4. Le microbiote des fromages à pâte molle et à croûte lavée (PMCL)

Du fait de leur mode d'affinage singulier, et en particulier des soins de croûte apportés durant la période d'affinage, les fromages PMCL (exemples : Epoisses, Maroilles, Munster, Livarot) possèdent un microbiote caractéristique riche et diversifié. Depuis deux décennies, de nombreuses études se sont attachées à décrire la composition du microbiote des fromages PMCL du monde entier, que ce soit par des méthodes d'isolement (Larpin-Laborde et al. 2011; Lavoie et al. 2012), d'empreintes moléculaires (Feurer et al. 2004a; Mounier et al. 2005; Rea et al. 2007; Mounier et al. 2009) ou plus récemment à l'aide des approches métagénomiques, en particulier la métagénomique aussi couramment appelée metabarcoding (Quigley et al. 2012; Delcenserie et al. 2014; Wolfe et al. 2014; Dugat-Bony et al. 2016a; Irlinger et Monnet 2021; Raymond-Fleury et al. 2022).

Sur ce type de fromages, les compositions microbiologiques de la croûte, diffèrent sensiblement de celles retrouvées à cœur (Dugat-Bony et al. 2016a; Choi et al. 2020; Raymond-Fleury et al. 2022). Ceci est principalement lié à l'exposition de la croûte au milieu extérieur ainsi qu'aux soins de croûtes appliqués lors du processus d'affinage, qui sélectionnent en surface des microorganismes majoritairement aérobies et halophiles (Kothe et al. 2021). Concernant les eucaryotes, les lavages répétés empêchent le développement des champignons filamenteux et ce sont ainsi généralement des levures, comme *Debaryomyces hansenii* et *Galactomyces geotrichum*, qui sont majoritaires sur ce type de fromages (Irlinger et Monnet 2021). Chez les bactéries, les LAB telles que *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* et des *Lactobacillaceae* dominent le cœur, tandis qu'en surface elles sont progressivement supplantées par de nombreuses espèces appartenant essentiellement aux phyla des *Actinobacteria* et des *Pseudomonadota* (Irlinger et Monnet 2021). Les espèces majoritaires peuvent varier en fonction de la variété de fromage mais aussi entre unités de production en considérant une même variété de fromage (Dugat-Bony et al. 2016a). Parmi elles, sont par exemple retrouvées des corynébactéries telles que *Glutamicibacter arilaitensis* et

Brevibacterium aurantiacum qui sont connues pour leurs capacités à produire des arômes (Bonnarme et al. 2000) ou encore des pigments caractéristiques (Galaup et al. 2015b; Giuffrida et al. 2016). Des bactéries psychrophiles et/ou halophiles sont également présentes, incluant des représentantes des genres *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Halomonas* et *Vibrio* (Dugat-Bony et al. 2016a). Certaines d'entre-elles sont connues pour produire des arômes d'intérêt lors de l'affinage du fromage (Deetae et al. 2007; Deetae et al. 2009; Irlinger et al. 2012).

A titre d'exemple, la croûte de l'Epoisses est fréquemment dominée en fin d'affinage par les levures *G. geotrichum* et *D. hansenii* associées aux bactéries *Glutamicibacter arilaitensis*, *Vibrio littoralis*, *Halomonas venusta* et plusieurs espèces de *Psychrobacter*, telles que *P. cibarius*, *P. aquimaris* et *P. nivimaris* (Irlinger & Monnet, 2021; Dugat-Bony et al., 2016).

2. Origine des microorganismes du fromage

Le lait cru possède un microbiote spécifique. Par la suite, les microorganismes qui colonisent la matrice laitière durant le processus de fabrication du fromage sont soit inoculés de manière délibérée par l'opérateur, soit proviennent de différentes sources qui sont regroupées sous le terme d'environnement de la fromagerie (ou « house microbiota » en anglais, **Figure 5**) (Bokulich et Mills 2013; Irlinger et al. 2015a). Leur implantation effective, dans le lait jusqu'au produit affiné, est soumise aux paramètres de fabrication employés.

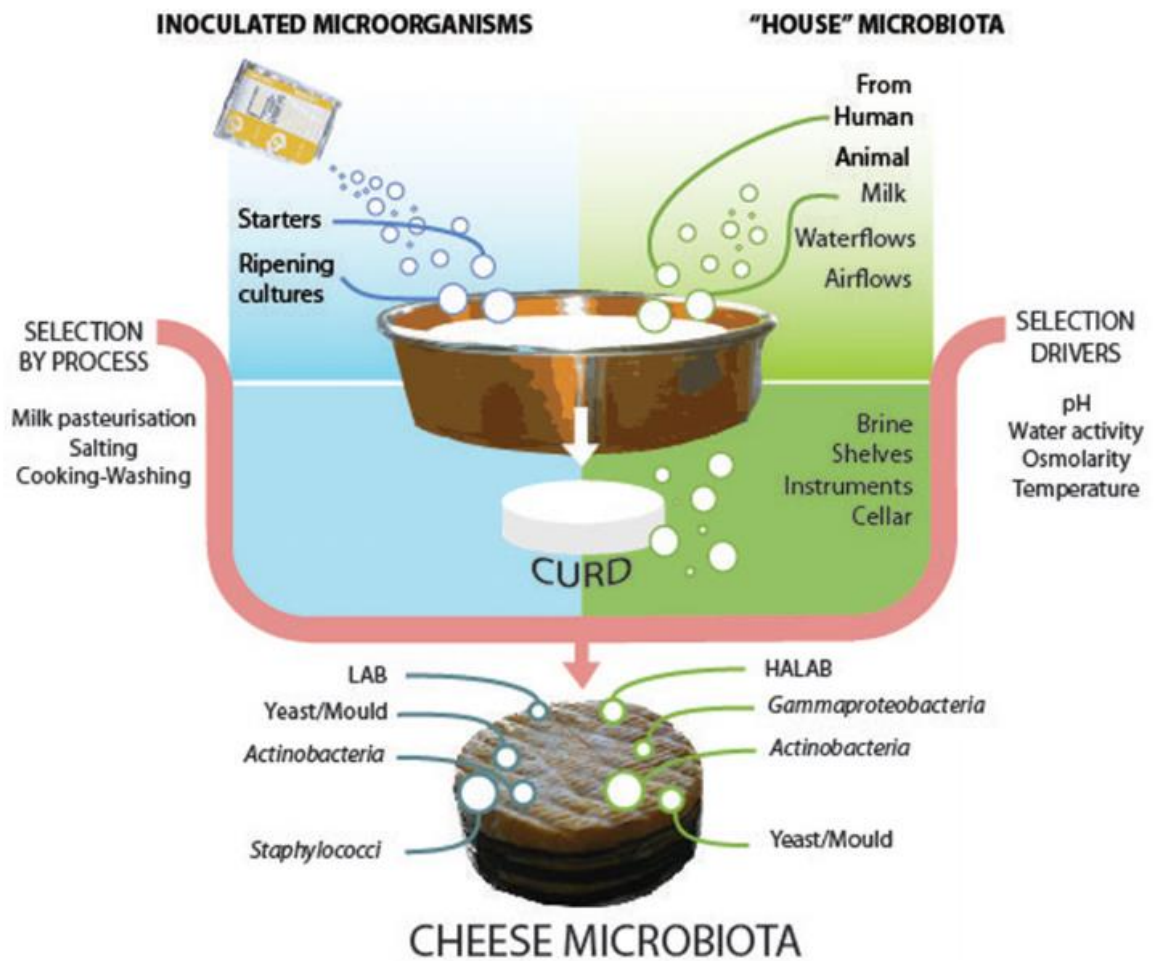


Figure 5 : Les sources des microorganismes du fromage (d'après (Irlinger et al. 2015a)).

2.1. Le microbiote du lait

Le lait cru contient naturellement des bactéries, des champignons filamenteux et des levures qui peuvent se retrouver dans le produit fini (Wouters et al. 2002). En tout, plus de 400 espèces différentes ont été détectées dans le lait cru, bactéries et champignons confondus (Montel et al. 2014b). Ces microorganismes, qui proviennent de l'air, du sol, de l'eau, ou encore des plantes, de la nourriture des animaux, de leurs mamelles (Verdier-Metz et al. 2012), des équipements de traite, et finalement se retrouvent dans le lait (**Tableau II**), en général à des concentrations totales comprises entre 5×10^3 et 5×10^4 UFC/ml (Mallet et al. 2012). Qu'il provienne de chèvres, de brebis ou de vaches, le lait cru est généralement dominé par des *Staphylococcus* et des bactéries corynéformes, comme par exemple des *Arthrobacter*, des *Brevibacterium* et des *Corynebacterium* (Montel et al. 2014b). Des bactéries propioniques, dont

certaines espèces du genre *Propionibacterium* ont également déjà été détectées dans le lait cru (Li et al. 2018).

Tableau II : Les origines des LAB du lait cru (d'après (Montel et al. 2014b)).

Sources	Microorganismes	Références
Machine de traite, tank à lait (même après traitement au chlore)	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	(Kagkli et al. 2007)
Fèces, mamelles, mains du personnel de traite, tank à lait, machine de traite	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	(Kagkli et al. 2007)
Fèces, ensilage, machine de traite	<i>Lactobacillus parabuchneri/kefri</i>	(Kagkli et al. 2007)
Gobelets trayeurs	<i>Lactobacillus</i>	(Bouton et al. 2007)
Machine de traite	<i>Lactobacillus lactis</i>	(Mallet et al. 2012)

2.1.1. Les bactéries du lait

Parmi les bactéries du lait, se trouvent des espèces qui peuvent présenter un intérêt technologique pour la fabrication du fromage, dont des LAB acidifiantes et des bactéries corynéformes. Elles sont accompagnées par d'autres bactéries qui sont relativement neutres par rapport à la fabrication, ou du moins pas encore assez bien caractérisées. Enfin, le lait peut être contaminé par des bactéries qui altèrent sa qualité et potentiellement celle du produit fini (les bactéries d'altération), voire le rendent impropre à la consommation (les bactéries pathogènes).

De nombreuses *Pseudomonadota*, souvent psychrotrophes, sont présentes dans le lait. Elles regroupent des bactéries telles que *Hafnia alvei* et des espèces appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Acinetobacter* (Hantsis-Zacharov et Halpern 2007; Ercolini et al. 2009). Certaines espèces sont considérées comme des bactéries d'altération puisqu'une fois dans le fromage, leur métabolisme peut entraîner l'apparition de défauts organoleptiques. La présence indésirable de bactéries sporulées est parfois observée, comme certaines espèces du genre *Clostridium* (Julien et al. 2008). Ces bactéries posent en particulier problème pour la fabrication des fromages à pâtes semi-dures et dures (exemples : Manchego, Gouda, Gruyère). En effet,

elles se développent en anaérobiose stricte et provoquent un gonflement tardif des meules suite à la fermentation de l'acide lactique, dont les produits sont le CO₂ et l'acide butyrique et le dihydrogène (Klijn et al. 1995; Garde et al. 2011).

Enfin, le lait animal contient parfois des bactéries pathogènes pour l'Homme. Les plus communément détectées dans le lait cru sont *Listeria monocytogenes*, les *Escherichia coli* productrices de shiga-toxines, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Salmonella* (*S. enterica* subsp. *enterica* sérotypes Typhimurium et Enteritidis) (Panthi et al. 2017).

2.1.2. Les champignons du lait

Concernant les levures, plusieurs espèces appartenant aux genres *Kluyveromyces*, *Galactomyces*, *Candida*, *Yarrowia*, *Pichia* ou encore *Rhodotorula* sont détectées dans le lait, dans des proportions variables selon l'échantillon analysé (Cocolin et al. 2002; Chen et al. 2010). Certaines interviennent dans le processus de fermentation, comme *Kluyveromyces marxianus* qui est capable de fermenter le lactose et de se développer dans le cœur des fromages (Fröhlich-Wyder et al. 2019).

Des champignons filamenteux sont également été détectés dans le lait cru, dont certains représentants des genres *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium* (Torkar et Vengušt 2008).

2.2. Les ferments

2.2.1. Les ferments lactiques

Dans le contexte fromager, les ferments lactiques (starters en anglais) sont souvent composés d'une combinaison des LAB suivantes, qui appartiennent toutes au phylum des *Bacillota*: *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* sp., *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *L. helveticus* (Parente et al. 2017).

Ces ferments sont soit définis (ce qui ne les empêche pas d'être complexes, c'est-à-dire qu'ils contiennent plusieurs espèces ou souches différentes) soit indéfinis lorsque leur composition exacte n'est pas connue, étant obtenus à partir du lait ou du lactosérum (**Figure 6**).

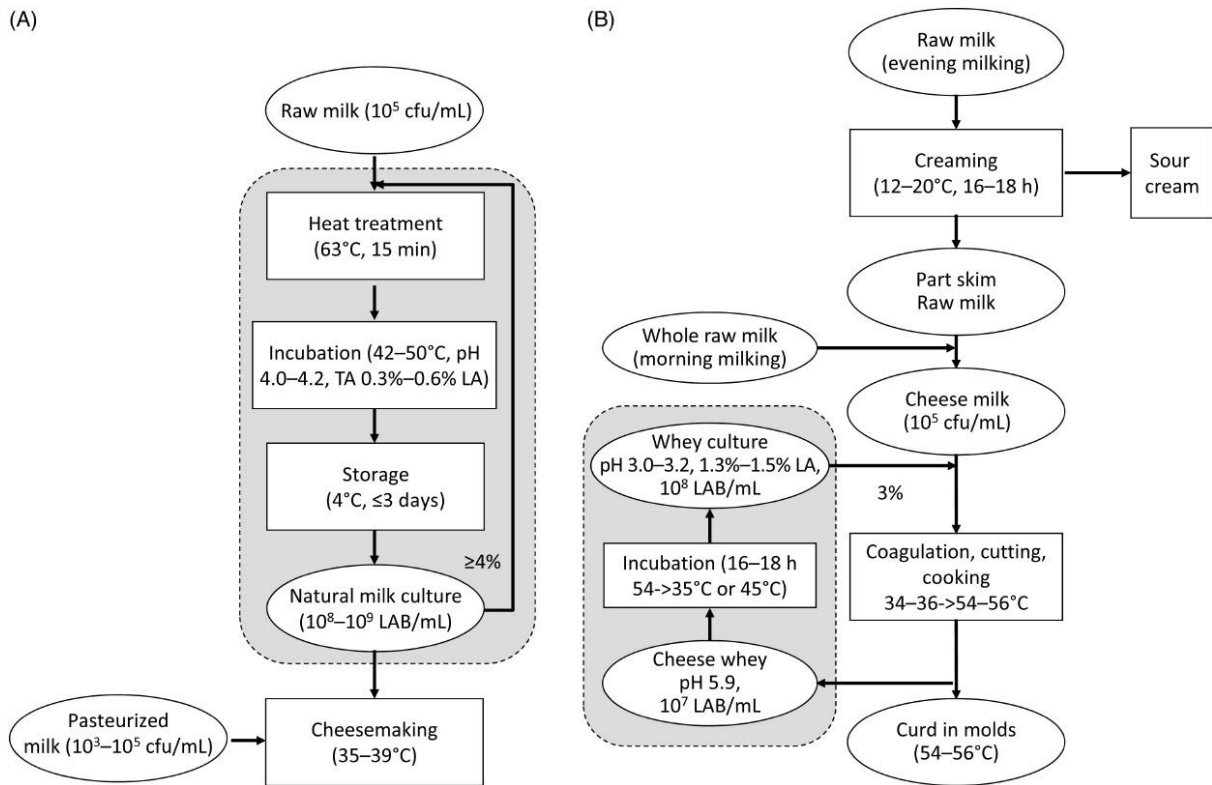


Figure 6 : Production d'un ferment naturel (indéfini) à partir de lait ou de lactosérum (d'après (Parente et al. 2017)).

Les ferments lactiques sontensemencés dès le début de la production, ou après traitement thermique du lait si ce dernier est autorisé. Ils sont souvent commercialisés sous forme lyophilisée, prête à l'emploi (concentration de 10⁸ UFC/g ou ml cellules viables). Leur rôle est d'acidifier le lait en produisant de l'acide lactique via la fermentation du lactose qu'il contient.

2.2.2. Les ferments d'affinage

Les ferments d'affinage (ou ferments secondaires) se composent de bactéries (NSLAB et corynéformes dont par exemple *Brevibacterium auranticacum* et *Glutamicibacter arilaitensis*). Ils peuvent aussi contenir des levures (*Debaryomyces hansenii*, *Galactomyces geotrichum*, *Kluyveromyces lactis* et *K. marxianus*) et des champignons filamenteux (*Penicillium camemberti* et *P. roqueforti*). Leur composition dépend beaucoup de la variété de fromage dans laquelle ils sont utilisés.

2.3. Les microorganismes indigènes

Outre le microbiote naturel du lait, de nombreux facteurs externes jouent sur la composition microbiologique du lait. De la traite jusqu'à l'affinage, le lait est enrichi en microorganismes

divers. Parmi les sources directes de micro-organismes, sont à prendre en compte le pis de l'animal (canal et surface externe), et les équipements de la ferme, dont la trayeuse, le lactoduc, et le tank de stockage (Montel et al. 2014b; Fréтин et al. 2018).

La présence de biofilms dans l'environnement de production, sur les surfaces en inox par exemple, qui peuvent être formés de bactéries psychrotrophes indésirables (Suárez et al. 1992), parfois en association avec des bactéries pathogènes comme *L. monocytogenes* (Marchand et al. 2012), ou de NSLAB indigènes (Somers et al. 2001), peut contaminer le produit.

L'utilisation de cuves en bois appelées « gerles » comme contenants pour le lait dans la fabrication du Salers, qui sont recouvertes d'un biofilm, permet un enrichissement du lait puis du fromage, recherché cette fois (Didienne et al. 2012). En effet, les espèces majoritaires détectées dans les gerles (Callon et al. 2004) sont retrouvées dans le fromage (*Leuconostoc spp.*, *Kluyveromyces lactis* et *K. marxianus*) (Callon et al. 2006).

Il est désormais démontré que le microbiote spécifique à chaque fromagerie artisanale est également bien souvent celui qui domine à la surface des fromages PMCL (Bokulich et Mills 2013), ce qui montre l'importance du microbiote « maison » dans la fabrication de ce type de fromages. Les microorganismes de surface qui constituent le « smear » orange-brun sont ceux qui contribuent majoritairement au développement des arômes des fromages PMCL (Mounier et al. 2006). Des ferments commerciaux contenant *Brevibacterium aurantiacum* (qui est souvent assimilé par erreur à l'espèce *B. linens* (Gavriš et al. 2004)), *Debaryomyces hansenii* et *Galactomyces geotrichum* sont souvent ajoutés à la morge, avec l'espoir que ces espèces s'implantent en surface de ce type de fromages. Néanmoins, certains auteurs ont montré que les souchesensemencées ne parvenaient pas forcément à se développer à la surface du fromage, et qu'elles sont régulièrement supplantées par des souches indigènes, parfois de la même espèce, probablement issues du microbiote « maison » de la fromagerie. Par exemple, il est connu que la/les souches de *B. aurantiacum*ensemencées, qui doivent apporter la couleur orange typique de ces fromages, peuvent être supplantées par des bactéries du genre *Arthrobacter* (Brennan et al. 2002; Feurer et al. 2004b; Goerges et al. 2008; Cogan et al. 2014). Pour autant, les fromages obtenus ne montrent pas nécessairement de défaut de coloration, puisque certaines souches de *Glutamicibacter* sont également capables de produire des pigments (jaune, rouge) (Sutthiwong et al. 2021).

3. Les pratiques permettant de contrôler le microbiote du fromage

Les méthodes de production jouent également un rôle non-négligeable sur la composition microbiologique du lait puis du fromage. Parmi elles, sont à considérer :

- le stockage du lait à 4 °C avant transformation, qui peut entraîner le développement de bactéries psychrotrophes indésirables (voir **Partie I**).
- le traitement thermique et la filtration du lait. La composition microbiologique du lait est à surveiller de près en début de procédé de fabrication du fromage, surtout lorsque le CDC requiert l'utilisation de lait cru. Autrement, il est possible d'appliquer divers traitements pour réduire fortement les densités de microorganismes présents dans le lait. Par exemple, un traitement thermique avec un barème temps/température plus ou moins poussé peut être appliqué. Le traitement thermique le plus « doux » est la thermisation. Le lait est chauffé pendant 15 secondes à une température comprise entre 63 et 65 °C. Elle est généralement réalisée avant réfrigération à 4 °C. Un traitement thermique plus poussé est la pasteurisation, qui se décline sous deux formes : la pasteurisation éclair, ou pasteurisation « HTST » pour High Temperature, Short Time qui porte le lait à une température de 72-74 °C pendant 15-30 secondes ; et la pasteurisation « LTLT » pour Low Temperature, Long Time, moins utilisée car plus longue, porte le lait à une température de 63-65 °C pendant 30 min (Panthi et al. 2017). Cependant, certaines bactéries dites « thermoduriques » résistent à ce traitement thermique, comme *Micrococcus* qui ne forme pas de spores (Bhowmik et Marth 1990), et *Bacillus cereus* ou *B. mycoides* qui en forment. Par ailleurs, certaines enzymes produites par des bactéries psychrotolérantes ne sont pas inactivées par la pasteurisation. C'est le cas des lipases et des protéases qui peuvent être responsables de goûts désagréables dans le lait (goût rance, amertume) et de baisses de rendement lors de sa transformation en fromage (Hantsis-Zacharov et Halpern 2007).

Une autre manière d'éliminer les bactéries du lait est de recourir aux techniques de filtration (L. Kelly et al. 2008). La technique la plus utilisée dans ce domaine est la microfiltration.

Enfin, il est possible d'associer plusieurs de ces techniques pour optimiser leur efficacité. Par exemple, combiner la microfiltration qui élimine la plupart des spores avec la pasteurisation qui élimine la plupart des cellules viables.

- l'ajout de ferments, que ce soient des starters lactiques ou des ferments d'affinage. L'objectif est d'implanter un consortium de microorganismes dont le métabolisme confère des propriétés recherchées (texture, couleur, arômes, etc.). L'ensemencement de ces microorganismes peut prendre plusieurs formes. Par exemple, il est possible de mettre en culture des ferments dans du lactosérum issu d'une précédente production pour assurer leur multiplication. Cela permet d'enrichir l'inoculum avec les microorganismes provenant du lactosérum, avant d'inoculer le lait en cours de fabrication par back-slopping. Une autre pratique d'ensemencement consiste à mettre en contact des fromages « jeunes », en début d'affinage, avec une solution saline enrichie avec les microorganismes de la surface de « vieux » fromages, plus affinés : c'est la technique du old-young smearing. Elle a pour intérêt de transmettre la flore d'affinage, mais peut aussi présenter l'inconvénient de contaminer les nouveaux fromages avec des microorganismes d'altération voire pathogènes (Mounier et al. 2006). Cette technique a donc été largement remplacée dans la pratique par l'ensemencement de ferments d'affinage commerciaux (Feurer et al. 2004b).
- l'utilisation du même bac de saumure sur plusieurs cycles de production successifs (Cotter et Beresford 2017), dont le microbiote, composé entre autres de LAB et de levures, vient enrichir celui du fromage.

L'impact des paramètres de production abiotiques tels que le salage, la température et humidité relative est détaillé en **Partie 4**.

Le microbiote des fromages est un sujet sur lequel une littérature particulièrement dense est disponible. Néanmoins, un élément majeur reste à explorer pour décrire complètement le microbiote des fromages : les bactériophages.

Partie III- Les bactériophages

1. Historique et définitions

Des virus animaux (Blackwell 1976; Holzmann et al. 2009; Balogh et al. 2010; Markovinović et al. 2016) et des bactériophages (ou « phages ») (Kleppen et al. 2011) peuvent être détectés dans les produits laitiers. Cette partie se concentre sur un groupe particulier de virus : les bactériophages, étymologiquement les « mangeurs de bactéries » (de βακτηρία « le bâton pour la marche » en grec qui a donné « *bacterium* » en latin, et φάγος, « glouton » en grec), qui infectent spécifiquement les bactéries.

Les bactériophages ont probablement été découverts séparément par Frederick Twort puis par Félix d’Hérelle au début du XX^{ème} siècle, qui est le premier à avoir employé le terme de “bactériophages” (Twort 1915; D’Herelle 1917). Ecologiquement, ce sont des parasites intracellulaires obligatoires. S’ils ont pendant un temps concurrencé les antibiotiques pour le traitement de certaines infections bactériennes, ils ont rapidement été abandonnés par la plupart des pays occidentaux au profit de ces derniers (Ravat et al. 2015). Dans certains pays de l’Est en revanche, à l’instar de la Géorgie, leur utilisation est restée monnaie courante jusqu’à aujourd’hui. L’étude de la biologie des bactériophages et de leurs interactions avec leurs hôtes a permis de faire de grands progrès en biologie moléculaire, où ils servent de modèles d’études (Réseau Bactériophage France 2022). De par la taille réduite de leur génome (de 3,5 à 540 kb d’après (Sausset et al. 2020)), ce sont les premiers microorganismes à avoir été séquencés. Par exemple, le séquençage du « petit » génome de φX174 date de 1977 (Sanger et al. 1977), et celui de λ de 1982 (Sanger et al. 1982). Ces deux phages infectant *Escherichia coli* possèdent respectivement un génome à ADN simple-brin (sb) de 5386 bases et un génome à ADN double-brin (db) de 48502 paires de bases.

2. Caractéristiques des phages

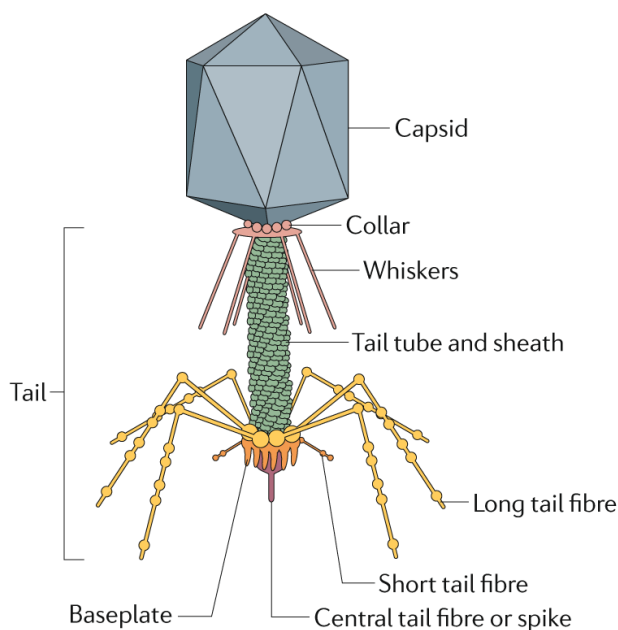
Un phage peut être caractérisé selon sa stratégie de réplication, sa taille et sa morphologie, son spectre d’hôtes, son mode d’encapsidation et son génome, qui permet de le classer selon la taxonomie actuelle. Les phages possèdent une capsid (aussi appelée « tête ») de nature protéique, parfois enveloppée d’une couche lipidique. Elle protège l’information génétique du phage, qui peut être portée par de l’ARN sb/db, ou de l’ADN sb/db (Callanan et al. 2018)). La

plupart des phages connus sont à ADN db et sont caudés, c'est-à-dire qu'ils possèdent une queue, de nature protéique. Les phages caudés présentent 3 morphologies distinctes (**Figure 7**):

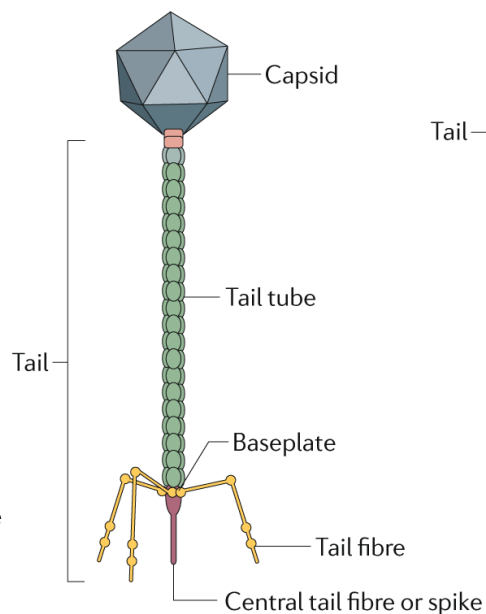
- les Myovirus possèdent une queue contractile
- les Siphovirus ont une queue non-contractile
- les Podovirus ont une queue très courte, appelée « pseudo-queue »

Les premières classifications s'appuyaient sur des critères morphologiques. Elles sont à présent remplacées par les informations génomiques obtenues par séquençage (Simmonds et al. 2017; Dutilh et al. 2021). Pour autant, il n'est pas possible de se contenter du séquençage d'un gène marqueur, à l'instar de l'ADNr 16S chez les bactéries. Il n'y a en effet pas de gène conservé qui serait présent chez tous les phages, ce qui oblige à séquencer les génomes complets pour pouvoir les comparer entre eux.

a Myoviridae



b Siphoviridae



c Podoviridae

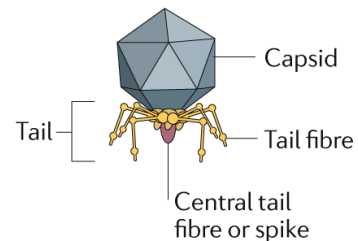


Figure 7 : La structure des phages caudés (d'après (Nobrega et al. 2018)). A noter que les familles *Myoviridae*, *Siphoviridae* et *Podoviridae*, ainsi que l'ordre des *Caudovirales* auquel elles appartenait n'existent plus (Turner et al. 2021). Les phages caudés sont désormais regroupés dans la classe des *Caudoviricetes* (ICTV 2022).

2.1. Les cycles de vie

Tous les phages n'adoptent pas la même stratégie pour se perpétuer. Néanmoins, la majorité des étapes de leurs cycles de vie sont communes. Elles sont détaillées ci-dessous.

2.1.1. La phase de recherche extracellulaire

Pour pouvoir se répliquer, le virion, qui est le terme qui décrit une particule virale lorsqu'elle se trouve dans le milieu extracellulaire, doit tout d'abord entrer en contact avec une bactérie hôte à infecter. Plusieurs paramètres influent sur les chances de rencontre entre un virion et son hôte :

- La mobilité : les phages, caudés ou non, ne sont pas capables de se déplacer activement. Pour autant, les virions ne sont pas immobiles, surtout en milieu liquide. En effet, ils diffusent passivement dans leur milieu, par mouvements browniens (Schlesinger 1932). Une étude a également montré que les phages sont aussi capables de diffuser dans des gels (Mueller-Merbach et al. 2007), tels que l'agar ou un caillé fromager. La vitesse de diffusion d'un virion dépend de sa taille et de sa forme (Lee et al. 2013). Ensuite, le virion peut aussi être entraîné par des courants turbulents, dans le cas d'un milieu sous agitation par exemple. Les bactéries hôtes sont également animés de mouvements diffusifs et non-diffusifs. Dans le cas des bactéries motiles, il a été montré que le taux de collision avec un phage augmentaient d'un facteur 2 (Koch 1960). Ainsi, plus la matrice dans laquelle le phage et son hôte évoluent est liquide, plus ils ont de chances de se rencontrer, et inversement si la matrice est rigide.
- La taille : plus la taille de la bactérie hôte est élevée, plus le phage a de chances de la rencontrer (Stent 1963).
- La concentration : plus les concentrations du phage et de son hôte sont élevées dans un milieu, plus ils ont de chances de se rencontrer. Certains auteurs ont cherché à établir le seuil de concentration (en hôtes ou en phages) en-dessous duquel les deux protagonistes ne parvenaient pas à se rencontrer. Par exemple, dans une optique de bioprotection contre des bactéries pathogènes, en inoculant 5×10^8 UFP/ml, l'hôte est rencontré et éliminé, indépendamment de sa concentration initiale (Bigwood et al. 2009). Une autre étude montre que plus la concentration initiale de l'hôte est élevée,

plus le phage commence rapidement (quelques heures) à se répliquer (Wiggins et Alexander 1985).

2.1.2. L'attachement

Après collision, ou « contact initial », le virion s'adsorbe réversiblement à des récepteurs primaires via ses protéines d'attache. Un exemple classique de protéines d'attache sont les protéines de liaison au récepteur (receptor binding proteins ou RBPs) situées aux extrémités des fibres de queue ou au niveau de la plaque basale (baseplate en anglais) (Sciara et al. 2010; Le et al. 2013). L'adsorption réversible s'appuie sur des interactions chimiques faibles aspécifiques. Elle est en outre sensible à différents paramètres environnementaux, comme le pH et la température (Conley et Wood 1975). Certains phages ont également besoin de la présence de cofacteurs pour s'adsorber, en particulier des ions monovalents (sodium, potassium) et divalents (magnésium, calcium) (Watanabe et Takesue 1972; Schwartz 1976).

Les récepteurs bactériens primaires sont divers. Le virion peut s'attacher à des sucres, des protéines ou des structures membranaires. Plus précisément, il cible des récepteurs de la paroi (peptidoglycane, protéines de transport –dont les porines-, etc.), mais aussi les capsules, les *pili* ou encore les flagelles. Certains récepteurs sont typiques des parois des bactéries à Gram positif, comme l'acide téichoïque, ou de celles des bactéries à Gram négatif, comme les lipopolysaccharides (LPS) (**Figure 8**) (Bertozzi Silva et al. 2016). Les fonctions assurées par ces récepteurs sont soit vitales pour la bactérie, soit lui confèrent un avantage sélectif. Il n'est donc pas surprenant que l'évolution ait sélectionné des phages ciblant spécifiquement ces structures essentielles chez l'hôte.

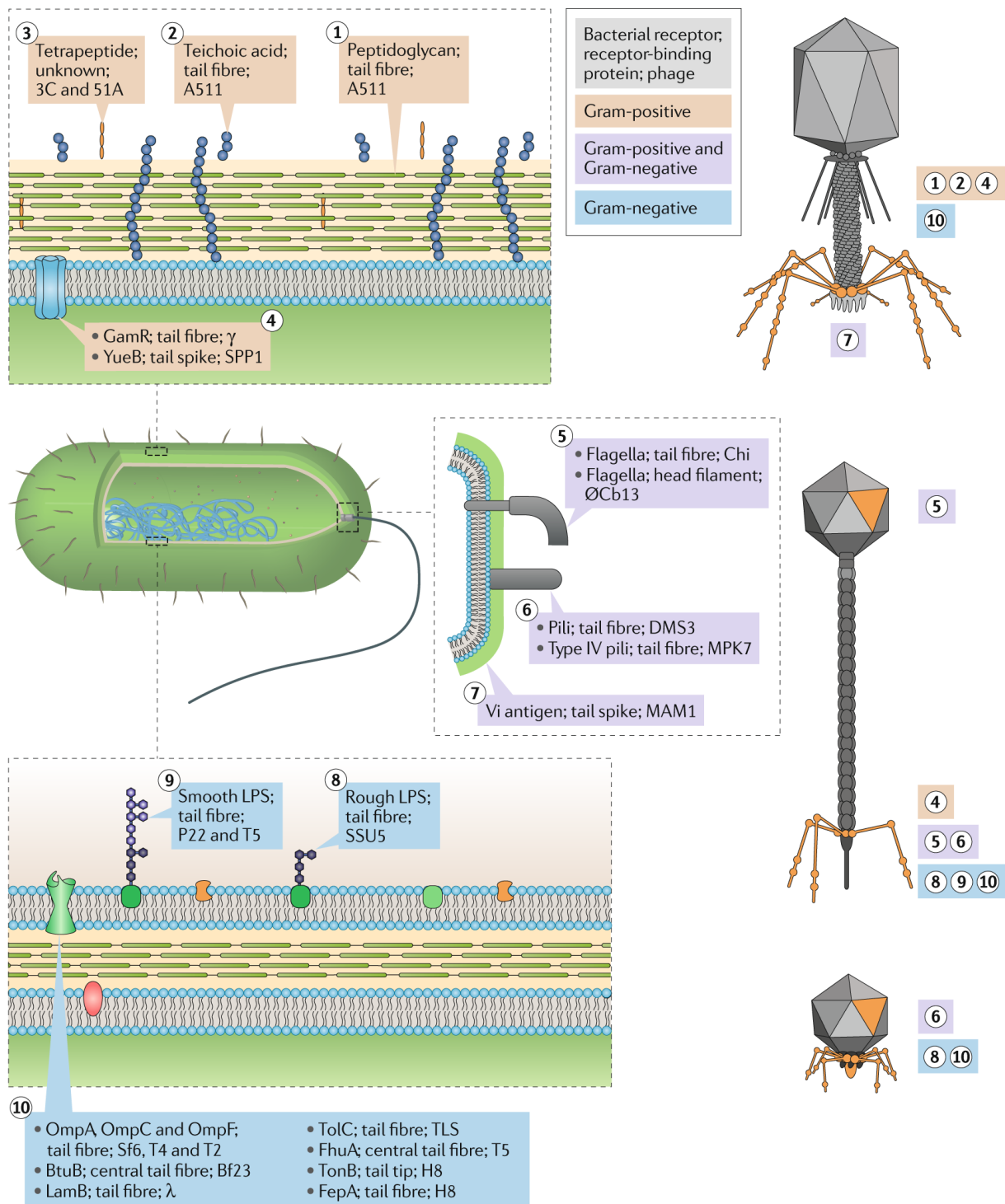


Figure 8 : Les récepteurs des bactéries (d'après (Nobrega et al. 2018)). Légende : LPS = lipopolysaccharide.

Dans un second temps, le virion se lie irrévérablement à des récepteurs secondaires (Storms et Sauvageau 2015). Le caractère irrévérrible se traduit par la force de l'interaction entre les deux récepteurs, et au changement de conformation de certaines protéines du phage. Par exemple chez le phage T4 infectant *E. coli*, ce sont les fibres de queue qui se déploient et se lient

au récepteur bactérien (des LPS en l'occurrence) (Hu et al. 2015). Cependant, si cette adsorption est irréversible, elle ne garantit pas pour autant le succès de l'infection pour le virion (voir 2.2.). Une fois attaché à la cellule hôte, le virion fait pénétrer son matériel génétique dans le cytoplasme via un mécanisme de translocation qui dépend du type de phage considéré. Cette étape implique de pouvoir traverser deux barrières chez les Gram + (paroi et membrane plasmique), et trois chez les Gram – (membrane externe, paroi et membrane interne) tout en conservant l'intégrité de la cellule le temps de l'infection.

2.1.3. La réplication

Une fois le matériel génétique du phage présent dans la cellule hôte, la phase de recherche extracellulaire s'achève, et la cellule infectée est qualifiée de « virocell » (Forterre 2013). Dès lors le phage débute son cycle de réplication et plusieurs cas de figure sont décrits (**Figure 9**) :

- Si le phage est virulent (exemple type : phage T7), il entame directement les étapes du cycle lytique : il détourne alors les machineries de réplication, de transcription et de traduction de l'hôte pour répliquer son génome et produire ses protéines de structure. Ensuite le matériel génétique est empaqueté dans la capsid. Le remplissage de la capsid commence par la reconnaissance d'une séquence spécifique nommée *cos* ou *pac*, et est suivie d'une première coupure. Lorsque la tête est pleine, une deuxième coupure, qualifiée de « terminale » intervient au site *cos* pour les phages *cos* ou au-delà du site *pac* pour les phages *pac* (Fujisawa et Morita 1997). Par la suite, le phage s'auto-assemble, avec l'attachement de la queue pour ceux qui en possèdent une. Les gènes impliqués dans ces étapes de morphogénèse, qui se succèdent chronologiquement, sont qualifiés de précoces, intermédiaires (qui ne sont pas présents chez tous les phages) et tardifs. Enfin, le phage mature produit des enzymes, généralement des holines ou des endolysines, voire des spanines pour les phages de bactéries à Gram négatif, qui lysent la paroi bactérienne et permettent le relargage des virions néo-assemblés dans le milieu extracellulaire.
- Si le phage est tempéré (exemple type : phage λ), il peut soit entamer un cycle lytique (productif) directement soit entrer dans un cycle lysogénique (ou latent/dormant). Dès lors, le génome du phage est intégré dans le chromosome de la bactérie hôte par recombinaison entre le site *attP* du phage et le site *attB* de la bactérie, grâce à l'action

d'une intégrase codée par le génome du phage. Il est répliqué passivement lors des divisions cellulaires de la bactérie hôte qui est alors qualifiée de bactérie lysogène.

Dans certains cas, le génome du phage peut également être circularisé et rester dans le cytoplasme de l'hôte pour former un épisome, qui est souvent perdu lors de la division cellulaire. Le terme prophage désigne le génome d'un phage intégré dans le chromosome bactérien ou existant sous forme de plasmide extrachromosomique. Sous certaines conditions, souvent de stress pour la bactérie lysogène, le prophage est induit (Filipiak et al. 2020). Après excision de son génome, le phage entame alors un cycle lytique classique (décrit ci-dessus), qui mène à la production de nouveaux virions. En conditions non-stressantes pour la bactérie hôte et à l'échelle de la population, le prophage s'auto-induit spontanément dans un nombre limité de cellules, à des fréquences variables. Par exemple, le niveau basal d'induction spontanée est d'environ 10^{-4} par cellule pour le phage λ (De Paepe et al. 2016). Il peut arriver qu'un prophage, suite à une mutation, ait perdu sa capacité à s'induire ou à s'assembler correctement. Il devient alors cryptique ou défectif (Casjens 2003). Ce phénomène peut être assimilé à un mécanisme de domestication du phage par la bactérie hôte dans la mesure où cette dernière acquiert des gènes supplémentaires par l'intermédiaire du prophage (Bobay et al. 2014). Les bactéries, en particulier les pathogènes, sont souvent polylysogènes, c'est-à-dire qu'elles hébergent plusieurs prophages différents (Harrison et Brockhurst 2017).

- Si le phage est filamenteux (exemple type : phage M13), son cycle de répllication actif est chronique. Cette stratégie a été jusqu'à présent plus marginalement rencontrée (Dennehy et Abedon 2021). Le phage se réplique sous forme épisomique, et des virions sont continuellement expulsés sans lyser la paroi de la bactérie hôte, par extrusion (cas des *Inoviridae*) ou bourgeonnement (cas des *Plasmaviridae*). Certains phages filamenteux, comme le *Vibrio* phage CTX ϕ sont capables d'entrer en lysogénie, et sont parfois qualifiés de phages « chroniques tempérés » (Hobbs & Abedon, 2016). Cependant, cette formule a le défaut de mélanger un type d'infection (chronique) et un type de phage (tempéré).
- La pseudolysogénie décrit un état transitoire durant lequel un phage n'est ni intégré dans le génome bactérien sous forme de prophage, ni engagé dans un cycle lytique (Łoś et Węgrzyn 2012). Dans ce cas de figure, son génome ne se réplique pas. Cela

arrive après l'étape d'infection, si la bactérie hôte est dans un état métabolique ralenti, par exemple en cas d'absence de nutriments disponibles dans le milieu.

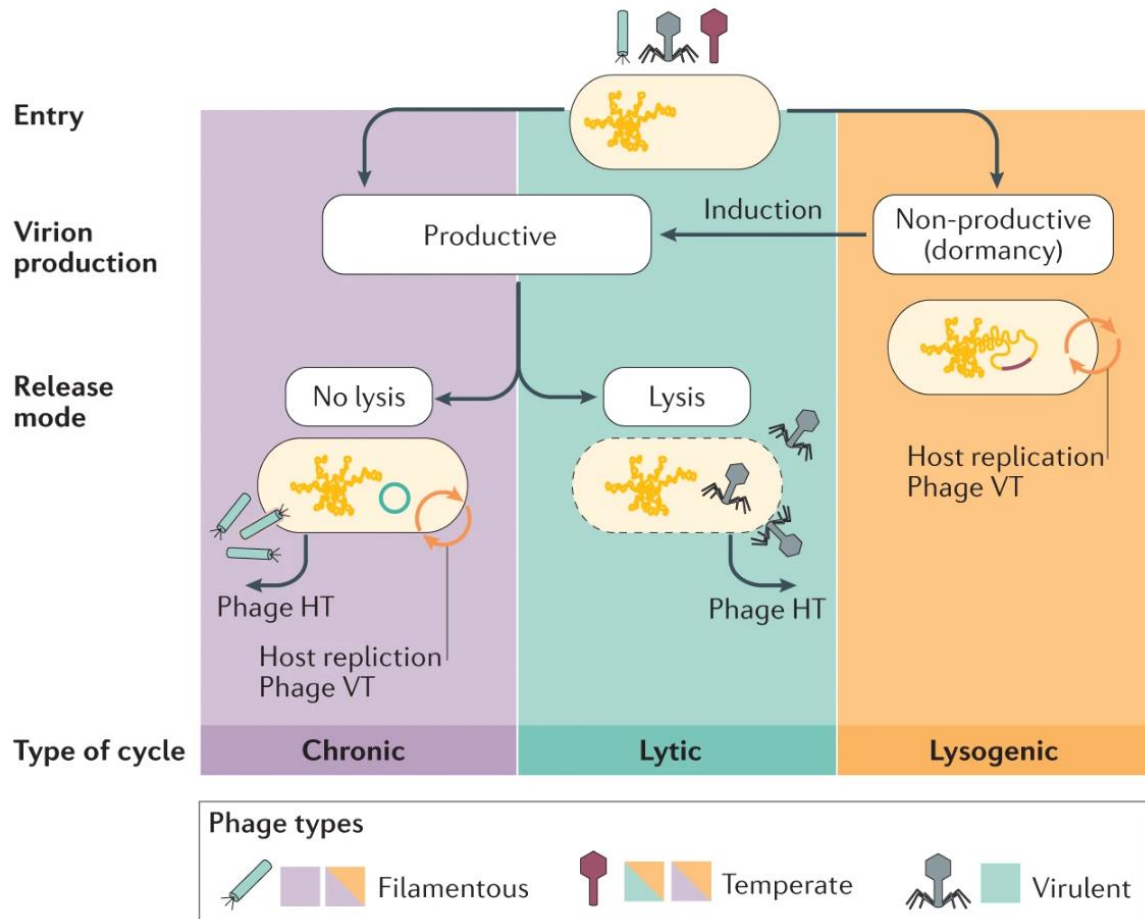


Figure 9 : Les trois principaux cycles des phages (d'après (Chevallereau et al. 2022)). Légende : VT = Vertical Transfer ; HT = Horizontal Transfer.

2.2. Echec de l'infection et mécanismes de défense

Plusieurs éléments peuvent conduire à une infection manquée, c'est-à-dire qui empêche définitivement le phage de se répliquer. Il est possible de distinguer les stratégies mises en place par les phages (contre d'autres phages) et celles mises en place par l'hôte bactérien.

2.2.1. Phages contre phages

Certains phages tempérés, lorsqu'ils sont intégrés, sont capables de modifier les récepteurs reconnus par les phages du même type, voire par d'autres phages, ce qui les empêche de s'adsorber de manière irréversible : c'est l'exclusion à la surinfection. Ce phénomène a été

décrit pour le phage BTP1 de *Pseudomonas*, qui code un gène modifiant l'antigène O, cible potentielle des protéines d'attache phagiques (Kintz et al. 2015; Bondy-Denomy et al. 2016). Cette stratégie est bénéfique pour le phage puisqu'elle permet d'éviter de « gâcher » des virions qui ne pourraient pas se répliquer s'ils pénétraient dans une cellule déjà infectée. Ce phénomène a aussi été décrit dans le cas où une particule virale essaierait d'entrer dans une bactérie déjà infectée par un autre virion de la même souche phagique, chez le coliphage T4 par exemple (Lu et Henning 1994). Le phage qui a déjà réussi à pénétrer dans le cytoplasme de l'hôte produit des protéines qui empêchent à la fois le transfert de l'ADN du second phage et la dégradation de la paroi bactérienne.

Pour d'autres phages, le blocage d'un phage identique sur-infectant s'effectue après injection, en empêchant la transcription. Ce phénomène, appelé « immunité à la surinfection », a été bien décrit chez le phage λ , et repose sur la production et l'action de la protéine CI par le prophage (Blasdel et Abedon 2013).

2.2.2. Défenses de l'hôte

Les bactéries ont mis en place plusieurs stratégies pour se prémunir de la prédation phagique :

- Accès et modification des récepteurs : la bactérie peut rendre l'accès à ses récepteurs membranaires moins aisé pour le phage. Par exemple, elle peut masquer ses récepteurs, les rendre inaccessibles par encombrement stérique (production d'exopolysaccharides qui empêchent le phage d'accéder à la surface de la bactérie), ou les saturer, puisque ces récepteurs se lient à des substrats impliqués dans le métabolisme classique de la bactérie (Bertozzi Silva et al. 2016). Il arrive aussi que les gènes codant les récepteurs membranaires de la bactérie mutent, ce qui modifie leur structure ou entraîne leur disparition si la mutation empêche la transcription du gène (Hyman et Abedon 2010).
- Empêcher le détournement de la machinerie de l'hôte : l'adsorption irréversible n'est pas toujours synonyme d'une infection réussie pour le phage, car il reste à l'hôte plusieurs lignes de défenses. Ainsi, la bactérie peut bloquer l'étape de translocation de l'ADN phagique. Elle peut également se servir d'enzymes de restriction-modification (endonucléases), qui dégradent l'ADN du phage (Vasu et Nagaraja 2013). Si les deux précédents mécanismes font partie de l'immunité innée de la bactérie, il est connu depuis une dizaine d'années que certaines bactéries présentent un mécanisme qui tient

davantage de l'immunité acquise (ou adaptative), et qui repose sur les CRISPR, pour Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, et les protéines Cas (Barrangou et al. 2007). Ce système permet à la bactérie de garder en mémoire une rencontre avec un phage, en intégrant un fragment de son génome, nommé « spacer », dans sa région répétée. Elle peut ensuite utiliser cette information lors d'une future infection, en transcrivant le spacer. Ce dernier se fixe de manière complémentaire au génome étranger, formant un complexe qui est reconnu et dégradé par les protéines Cas (Deveau et al. 2010). La combinaison de plusieurs mécanismes de défense (par exemple les systèmes de restriction-modification et CRISPR-Cas) rend la protection plus efficace (Dupuis et al. 2013).

- Suicide cellulaire : L'infection abortive conduit à la mort de l'hôte, qui se « sacrifie » pour empêcher la production de nouveaux virions (Fineran et al. 2009). Ce mécanisme est par exemple présent chez *Lactococcus lactis* et cible des phages des groupes 936, c2 et P335 (Chopin et al. 2005).

De nouveaux mécanismes de défense « anti-phages », généralement peu spécialisés et moins efficaces, sont sans cesse découverts chez les bactéries (Bernheim et Sorek 2020). La même dynamique est à l'œuvre pour les phages, puisque leurs mécanismes visant à contourner les défenses bactériennes évoluent sans cesse. Ce phénomène est communément appelé « arm race » dans la littérature, ce qui se traduit par « course à l'armement » (Weitz et al. 2005).

3. Les bactériophages dans l'industrie laitière

Les phages sont particulièrement bien connus dans tous les procédés biotechnologiques qui reposent sur l'utilisation de bactéries en concentrations élevées. Les fermentations en industrie laitière en sont un des exemples les mieux étudiés (Garneau et Moineau 2011).

3.1. Les phages des ferments lactiques

C'est en 1935 que les premiers phages de LAB ont été isolés à partir de ferments lactiques mésophiles (Whitehead et Cox 1935). A partir de là, de nombreuses études, et ce jusqu'à nos jours, ont rapporté des cas d'infection de ferments lactiques par des phages. Comme détaillé plus haut, les LAB jouent un rôle majeur dans l'acidification, qui elle-même influe sur la coagulation du lait. Ceci explique pourquoi l'incidence des phages de LAB en industrie laitière est aussi bien documentée : leur activité lytique peut ralentir, voire stopper la production en

cours, ce qui se traduit par des pertes économiques parfois considérables (Pujato et al. 2019). L'attaque des ferments par des phages représente d'ailleurs la cause majeure de complications au cours de la fermentation (Garneau et Moineau 2011). Par conséquent, les phages les mieux étudiés sont logiquement ceux qui infectent les ferments les plus fréquemment utilisés, c'est-à-dire *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus* sp. et *Leuconostoc* sp. (Marcó et al. 2012). Les phages infectant *L. lactis* ont été très souvent isolés, et ont été classés en dix espèces, sur la base de leurs morphologies et de critères d'homologie de l'ADN (Deveau et al. 2006; Samson et Moineau 2010). Sur les dix groupes, trois sont fréquemment rencontrés au cours des fermentations laitières : le groupe 936, auquel appartiennent les phages les plus souvent isolés, qui regroupe des phages virulents (le phage type de cette espèce est p2 (Bebeacua et al. 2013)); le groupe c2, qui regroupe également des phages virulents (phages bien connus = c2 et bIL67 (Romero et al. 2020)); et enfin le groupe P335, dans lequel sont rangés à la fois des phages virulents et tempérés (membres bien étudiés = TP901-1 et Tuc2009 (Romero et al. 2020)). Les groupes 936 et c2 ont récemment été reclassés dans les genres *Skunavirus* et *Ceduovirus*, respectivement (Romero et al. 2020). Les phages de *Lactococcus* sont principalement des Siphophages (8 espèces), avec seulement quelques représentants des Podophages (2 espèces) (Samson et Moineau 2010; Mahony et al. 2012).

3.2. Les phages de bactéries non acidifiantes

Il existe également des phages qui infectent d'autres types de bactéries dans le fromage.

- Phages de *Propionibacterium freundenreichii*

Les premiers phages tempérés et filamenteux (Gautier et al. 1999; Chopin et al. 2002; Cheng et al. 2018) infectant *Propionibacterium freundenreichii* ont été isolés à partir de fromages à pâte pressée cuite (type Emmental) (Gautier et al. 1992). Cette bactérie d'affinage est classiquementensemencée dans ce type de fromages, où elle produit des arômes, de la vitamine B12, et forme les ouvertures typiques dans le cœur. Sur 30 souches de *P. freundenreichii* testées, seule une souche isolée d'un fromage du même type est sensible. Les mêmes auteurs sont parvenus à isoler des phages de *P. freundenreichii* à partir de différentes variétés de fromages à pâtes pressées cuites (Comté, Emmental, Fribourg et Maasdam), et ce à plusieurs mois d'intervalles, ce qui montre la persistance de la contamination (Gautier et al. 1995a; Gautier et al. 1995b). Les concentrations des phages isolés étaient comprises entre 14 UFP/g et 7×10^5 UFP/g de

fromage. Un lien entre le lait utilisé et la fréquence d'apparition des phages a pu être établi : les fromages au lait cru sont plus souvent contaminés que les fromages dont le lait a été traité thermiquement. Les auteurs se sont également intéressés à l'origine de la contamination phagique : ils ne sont pas parvenus à isoler les phages du caillé, ni des ferments, mais ont détectés leur présence dans deux échantillons de lait, sur les 70 testés. Globalement, ces bactériophages sont le plus souvent isolés lors de l'affinage des fromages en chambre chaude (22-24 °C), lorsque les hôtes sont les plus abondants. Ces phages semblent coexister avec leurs hôtes, aucun effet sur le bon déroulement de l'affinage n'ayant été relevé au cours des différentes études menées.

- Phages de bactéries d'affinage d'un fromage de type PMCL

Le premier métavirome de la croûte d'un fromage PMCL a été étudié récemment (Dugat-Bony et al. 2020). Ce fromage a été choisi parmi 2 autres (une à pâte molle et à croûte fleurie et un à croûte naturelle) après optimisation du protocole d'extraction des particules virales, sur la base du nombre de particules obtenues et de la densité bactérienne élevée qu'il abrite. Certains contigs (séquences génomiques assemblées) produits présentent une homologie nucléotidique avec des génomes de phages précédemment déposés dans les bases de données de séquences publiques, et qui sont connus pour infecter des bactéries appartenant aux genres *Glutamicibacter*, *Lactococcus*, *Pseudoalteromonas* ou encore *Leuconostoc*. Les deux contigs les plus abondants présentent justement des similitudes avec des phages infectant *Glutamicibacter* et *Lactococcus* (respectivement 63% et 28% de l'abondance relative du métavirome). Cet article suggère donc la présence de phages infectant des bactéries d'affinage à la surface de ce fromage à pâte molle et à croûte lavée.

- Phages de *Brevibacterium aurantiacum*

Peu après, l'isolement de 62 phages infectant une souche de *Brevibacterium aurantiacum* (SMQ-1335) à partir de croûtes de fromages canadiens à croûtes lavées et de leur environnement de production (solutions de soin, drains, sol, étagère, table, mur) a été rapporté (de Melo et al. 2020). Les échantillons provenaient de 3 usines différentes, suivies entre 2013 et 2016, dont les fromages présentaient des défauts d'arôme et de coloration dus à la présence de phages. L'étude s'est concentrée sur 16 des 62 isolats initiaux, et a montré que tous étaient des Siphophages virulents. Le séquençage et l'annotation de leurs génomes a révélé leur

grande similarité : au moins 97.80% d'identité nucléotidique ; mais qu'ils possédaient néanmoins des répétitions en tandem qui permettaient de délimiter 8 groupes différents. Ces répétitions en tandem sont très répandues dans les génomes de phages (85% des génomes déposés dans les bases de données de séquences en possèdent), mais leur rôle exact reste à déterminer.

3.3. L'utilisation des phages pour la bioprotection du fromage

Plusieurs articles soulignent l'importance des phages dans l'industrie alimentaire, qui sont tour à tour redoutés ou utilisés intentionnellement afin de limiter le développement de bactéries spécifiques (Fernández et al. 2017; Fernández et al. 2018; de Melo et al. 2018; Połaska et Sokołowska 2019). En général, ce sont des phages virulents qui sont sélectionnés pour ce deuxième type d'applications et les bactéries visées sont soit impliquées dans l'altération des produits, soit pathogènes pour l'homme.

3.3.1. Le biocontrôle des bactéries d'altération

Le développement de certaines bactéries dans les aliments peut avoir un effet néfaste sur la qualité du produit fini. C'est par exemple le cas d'*Enterococcus faecalis*, qui est responsable de la production d'amines biogènes (exemples : tyramine, putrescine, histamine) qui s'accumulent dans les produits laitiers (Linares et al. 2011) ou la viande (Maijala et al. 1993). Certains consommateurs y sont particulièrement sensibles : leur ingestion peut entraîner des intoxications alimentaires (Shalaby 1996). Le contrôle de la production des amines biogènes dans les aliments est donc un enjeu majeur en termes de sécurité des aliments. Dans cette optique, un phage dirigé contre *E. faecalis* a été isolé à partir d'un fromage de chèvre espagnol au lait cru (Ladero et al. 2016). Il est capable d'infecter 10 souches d'*E. faecalis* sur les 27 testées, et de réduire de 85% la production de tyramine dans un fromage modèle.

Un autre phage infectant *E. faecalis*, également isolé d'une matrice fromagère (cette fois un fromage au lait de brebis pasteurisé et à pâte semi-dure) était capable d'infecter 20 des 27 souches testées (les mêmes que dans l'étude précédente). Il peut également réduire de 95% la production de tyramine et de 78% celle de putrescine au sein d'un fromage modèle (Del Rio et al. 2019).

Enfin, une étude récente a encore accru l'effort d'échantillonnage, puisque 60 fromages ont été testés pour leur présence en phages ciblant *E. faecalis* (del Rio et al. 2021). Aucun des 22 phages isolés ne s'est montré capable d'infecter plus de 20 souches (sur les 27 testées). Cependant, comme leurs spectres d'hôtes sont différents, l'utilisation d'un cocktail de phages pourrait permettre de couvrir l'ensemble des hôtes et donc de réduire efficacement les concentrations d'amines biogènes dans le fromage.

3.3.2. Le biocontrôle des bactéries pathogènes

Une littérature encore plus abondante rapporte l'utilisation de phages pour lutter contre les bactéries pathogènes (O'Sullivan et al. 2020). Ci-dessous, quelques exemples avec des bactéries fréquemment impliquées dans des toxi-infections alimentaires.

- *Listeria*

Listeria monocytogenes contamine fréquemment les fromages, surtout les pâtes molles (Guenther et Loessner 2011). Le phage A511, dirigé contre cette bactérie, a été testé au cours des 3 semaines d'affinage de deux fromages à pâte molle, un type Camembert et l'autre type Limburger. Lorsque le pathogène est ensemencé à des concentrations élevées (1×10^3 UFC/cm²), une à plusieurs applications de 3×10^8 UFP/cm² ne suffit pas à l'éliminer, et il se redéveloppe en fin d'affinage. Lorsque la contamination initiale est moins élevée (1×10^2 UFC/cm² et 1×10^1 UFC/cm²), la même dose de phage A511 rend la détection du pathogène impossible après 6 et 1 jours respectivement.

- *Salmonella*

Le phage SJ2, infectant une souche de *Salmonella* Enteritidis, est capable de réduire de 2 log la concentration du pathogène dans un Cheddar au lait cru, et de 3 log dans un Cheddar au lait pasteurisé (mesure prise 24h après la fin de la fabrication). *S. Enteritidis* était ensemencée à 10^4 UFC/ml en début de fabrication, et le phage était concentré à 10^8 UFP/ml (Modi et al. 2001).

- *Staphylococcus*

Staphylococcus aureus contamine régulièrement les produits laitiers, pasteurisés ou non, où il produit des entérotoxines. Son contrôle est donc d'une importance majeure. Une équipe a donc cherché à isoler des phages virulents de l'environnement laitier, en vue de tester leur

efficacité contre une souche indicatrice de *S. aureus*, Sa9 (García et al. 2007). Cependant, malgré des efforts répétés, les auteurs ne sont pas parvenus à isoler de phage virulent. Dans un premier temps, deux phages tempérés (Φ H5 et Φ A72) ont été isolés du lait cru après enrichissement avec la souche indicatrice *S. aureus* Sa9. Cependant, l'utilisation de ces phages en cocktail ne permettait pas d'éliminer complètement le pathogène, et avait l'inconvénient de faire émerger de nombreux variants résistants, ce qui réduit encore leur efficacité sur la durée. Il est possible d'imaginer que plutôt que de véritables variants résistants, les auteurs ont été confrontés à l'immunité à la surinfection. Deux phages virulents (Φ 88 et Φ 35) ont donc été générés par traitement des phages tempérés au pyrophosphate de sodium, qui provoque des délétions aléatoires de l'ADN ; seuls les phages ayant perdu une portion d'ADN sont viables, ce qui permet après plusieurs passages d'obtenir des mutants qui ont perdu leur capacité à lysogéniser, et sont donc virulents, ou « ex-tempérés ». Des mutants résistants à ces phages apparaissent à une fréquence ($1,3 \pm 0,24 \times 10^{-6}$) 200 fois moins élevée que dans le cas du couple tempéré ($2,5 \pm 0,12 \times 10^{-4}$). L'efficacité de ces phages virulents pour éliminer la souche indicatrice *S. aureus* Sa9 a ensuite été démontrée au sein d'un milieu de culture (LB), de lait entier UHT, d'un caillé lactique et d'un caillé présure. Dans le cas du lait, *S. aureus* Sa9 était inoculée à une concentration de 3×10^6 UFC/ml et le cocktail à une multiplicité d'infection (MOI) de 100 (i.e. 100 phages pour une bactérie). Le pathogène était totalement éliminé après 2h d'incubation. Ensuite, dans le caillé acidifié par *L. lactis* subsp. *lactis* IPLA 947, *S. aureus* Sa9 (1×10^6 UFC/ml) était éliminée après 4h d'incubation par le cocktail (MOI de 250). Cette élimination a eu lieu avant que l'acidification liée au ferment n'affecte négativement la viabilité des phages. Enfin, dans le caillé présure (absence de ferment lactique), la culture de *S. aureus* Sa9 (1×10^6 UFC/ml) n'était plus détectée après seulement 1h d'incubation par le cocktail (MOI de 350). Le pH étant stable, il n'entraîne pas de variation du titre de phages.

Ces deux phages virulents sont donc capables de protéger efficacement le lait au cours de sa transformation, même lorsqu'il est contaminé par *S. aureus* Sa9 à des niveaux élevés (10^6 UFC/ml).

En plus de l'élimination du pathogène, il faut s'assurer que le phage agit suffisamment rapidement pour empêcher *S. aureus* de produire des entérotoxines. L'utilisation de deux cocktails de phages (trois phages différents dans chaque) dans du lait pasteurisé et un Cheddar

non-affiné contaminés avec 10^6 UFC/ml (*S. aureus* SMQ-1320) permettent d'inhiber totalement la production d'entérotoxine C (El Haddad et al. 2016).

3.4. Les sources de contamination

Des phages sont présents, en faibles quantités, dans le lait cru (Ly-Chatain et al. 2011). La matière première utilisée pour la fabrication du fromage peut donc être une première source de contamination. Les ferments eux-mêmes sont également une source majeure de phages dans l'industrie laitière. En effet, de nombreuses LAB sont lysogènes, voire polylysogènes, ce qui est fréquemment observé chez les espèces du genre *Streptococcus* (Toit et al. 2014). Dans les unités de production de fromage, les phages peuvent contaminer toutes sortes de surfaces (de Melo et al. 2020) et même être présents dans l'air (Verreault et al. 2011; Colombo et al. 2018), suite à leur vaporisation lorsque les équipements sont lavés avec des jets d'eau sous haute pression.

4. Le contrôle des bactériophages en industrie laitière

Pour lutter contre la présence et la persistance des phages problématiques, l'industrie laitière a progressivement adopté, grâce aux nombreuses connaissances scientifiques générées sur le sujet au cours des trente dernières années, un certain nombre de pratiques (**Tableau III**). Ces moyens de contrôle des phages en industrie laitière reposent sur les stratégies suivantes :

- l'utilisation de produits biocides lors du nettoyage de l'usine, tels que l'acide peracétique ou l'hypochlorite de sodium (Guglielmotti et al. 2012).
- le traitement thermique du lait, qui permet d'inactiver la plupart des phages. Cependant, de nombreux auteurs observent que la pasteurisation ne permet pas toujours de protéger efficacement la fermentation, puisque certains phages sont thermorésistants (Wagner et al. 2017b). Par exemple, le phage de *Lactococcus lactis* P680 résiste à la pasteurisation et même à un traitement à 95 °C pendant 5 min (Atamer 2022). Ce phénomène a également été observé pour des phages infectant *Leuconostoc mesenteroides* et *L. pseudomesenteroides* (Atamer et al. 2011).
- l'utilisation de hautes pressions sur le lait peut permettre de réduire sa concentration en phages. Par exemple, après 5 passages sous hautes pressions dynamiques, le titre de trois phages infectant *Lactococcus lactis* a été diminué de 2,8 à 3,7 log selon le phage considéré (en partant d'une concentration de 10^9 UFP/ml) (Moroni et al. 2002).

L'utilisation couplée d'un traitement thermique et de haute pression permet d'obtenir de meilleurs résultats sur l'inactivation de deux phages infectant *Lactococcus lactis* en comparaison avec l'effet des traitements seuls (Müller-Merbach et al. 2005). L'effet synergique apparaît au-dessus de 60 °C et 450 MPa.

Éliminer totalement les phages d'une usine constitue un défi impossible à relever (Pujato et al. 2019). En revanche, prendre des dispositions pour limiter leur incidence sur la fabrication est tout à fait réalisable. Pour cela, une série de mesures préventives sont largement adoptées dans l'industrie laitière :

- éviter de réincorporer de la poudre de lactosérum potentiellement contaminée par des phages en cours de procédé (Wagner et al. 2017a).
- mettre en place des rotations de cultures pour les ferments lactiques, c'est-à-dire changer régulièrement le mélange de souches bactériennes inoculées. En effet, même si la résistance aux bactériophages fréquemment rencontrée en industrie laitière fait partie des critères essentiels au moment de la conception des ferments, et qu'elle facilite leur implantation lors des premiersensemencements, elle ne garantit pas la viabilité de leur utilisation sur le long terme. D'une part, il est peu probable que les souches sélectionnées résistent à tous les phages qu'elles sont susceptibles de rencontrer au cours du procédé. D'autre part, le caractère résistant ou sensible d'une souche donnée n'est pas toujours stable dans le temps, puisque les mécanismes de résistance sont soumis à la pression de sélection. En effet, leur maintien représente un coût pour la bactérie et ils sont généralement perdus lorsque la bactérie n'est plus menacée (Skanata et Kussell 2021). Dans le processus de bras de fer entre mécanismes de résistance de l'hôte et contournement de ces mécanismes par le phage, il est fort possible que les bactéries initialement résistantes deviennent sensibles après quelques cycles de production.
- préférer l'utilisation de ferments complexes aux ferments définis. Les ferments complexes (ou indéfinis) sont obtenus à partir de ferments naturels et reproduits en conditions contrôlées par des sociétés spécialisées (Parente et al. 2017). Du fait de la plus grande diversité génétique des bactéries qu'ils contiennent, le fromager peut espérer qu'une ou plusieurs souches arrive à s'implanter et réalise l'acidification désirée,

malgré la prédation par des phages. Le fait que ces derniers aient en général un spectre d'hôtes assez restreint participe à rendre cette stratégie viable.

Tableau III : Les moyens de contrôle des phages en industrie laitière, traduit à partir de (Marcó et al. 2012).

Origine des phages	Stratégies de contrôle	Méthodes d'application	Remarques
Environnement de fabrication	Conception de l'usine et des équipements	Séparation physique des différentes parties de l'usine	L'efficacité dépend de la sensibilité des phages, de la charge initiale en phages et du milieu de suspension
		Utilisation de zones de fabrication spécifiques aux différentes technologies employées	
		Utilisation d'air filtré et de pression positive	
		Contrôle des bioaérosols	
	Conception de la production	Optimisation des étapes de fabrication	
	Nettoyage	Utilisation de nettoyants/désinfectants efficaces	
Traitements physiques (UV, photocatalyse)			
Lait cru	Stockage réfrigéré des matières premières		
	Traitement des matières premières	Traitements thermiques des matières premières et ingrédients	L'efficacité dépend de la sensibilité des phages, de la charge initiale en phages et du milieu de suspension
		Technologies hautes pressions	Seulement si validées par des tests en laboratoire
	Ferments primaires		Utilisables pour tous types de fabrications
	Utilisation de ferments résistants aux phages	Mutants résistants aux phages	Méthode simple d'utilisation, sans restrictions réglementaires, applicable à de nombreuses espèces de LAB
		Dérivés résistants aux phages	Souches possédant naturellement des mécanismes de résistance aux phages

		Organismes génétiquement modifiés	Disponibles seulement dans certains pays
	Planning de rotation des ferments		Adapté à de nombreux types de procédés à l'exception des probiotiques
			Diversité phagique augmentée
Eau en tant qu'ingrédient	Utilisation d'eau microbiologiquement saine		
Ingrédients transformés ou recyclés (lactosérum e.g.)	Manipulation adéquate du lactosérum	Eviter la génération de bioaérosols (drains fermés)	L'efficacité dépend de la sensibilité des phages, de la charge initiale en phages et du milieu de suspension
		Nettoyage avant recyclage (traitements thermiques)	
		Elimination adéquate	
		Limiter le recyclage des déchets finaux au sein de l'usine	
Souches lysogènes	Vérification de leur absence au moment de sélectionner les ferments définis		

5. Les méthodes d'études des phages dans les aliments

A l'instar des autres microorganismes, il est possible d'observer, d'isoler et de séquencer les phages directement à partir d'une matrice alimentaire, ce qui donne une vision parcellaire de la communauté virale. Ou bien, si l'intérêt se porte sur l'ensemble de la communauté, il faut extraire l'ensemble des acides nucléiques viraux, puis recourir aux méthodes de séquençage haut-débit (méthode shotgun). En industrie laitière, il est important de disposer de méthodes de diagnostic rapide, afin de savoir si, et par quel phage, les cultures sont attaquées.

5.1. Les méthodes de comptage des particules

Il est possible d'observer des particules phagiques en solution, suite à une préparation à partir d'un aliment. Par exemple, les phages de la surface du fromage peuvent être visualisés directement après homogénéisation, filtration (avec des filtres de porosité 0,22 ou 0,45 µm pour éliminer les autres microorganismes) et éventuellement concentration au polyéthylène

glycol. Des méthodes telles que la cytométrie en flux (Brussaard 2009) ou la microscopie en épifluorescence (Ortmann et Suttle 2009), qui reposent sur le marquage préalable de molécules comme l'ADN à l'aide d'un fluorochrome, permettent de les dénombrer. Il est aussi possible de compter les nanoparticules à l'aide d'un interféromètre (Roose-Amsaleg et al. 2017). Dans ce cas, une source lumineuse associée à une caméra permet de compter les particules en mouvement qui défilent devant l'objectif, après dépôt de quelques μl de phages en solution (Turkki et al. 2021). Cette technique a par exemple été utilisée pour donner une estimation de la concentration en particules virales en surface de trois types fromages (Dugat-Bony et al. 2020).

L'observation d'un phage en particulier nécessite sa purification préalable par isolements successifs. Il faut ensuite le concentrer suffisamment avant de pouvoir l'observer par microscopie et/ou le caractériser.

5.2. Les méthodes basées sur l'isolement

Les méthodes à disposition pour caractériser un phage sont similaires à celles qui sont utilisées pour les autres microorganismes. Ainsi, ils sont observables par microscopie, il est possible de déterminer leurs paramètres de croissance, ou encore de séquencer et d'annoter leur génome.

5.2.1. Les méthodes de microscopie

La méthode la plus répandue est la microscopie électronique à transmission (MET), qui permet d'observer les phages, dont la taille est de l'ordre de la dizaine à la centaine de nanomètres, du sommet de la capsidie à l'extrémité de la queue. Il faut avoir préalablement fixé l'échantillon sur une plaque et marqué négativement les phages avant observation. La coloration se fait en général avec de l'acétate d'uranyle, mais la difficulté de son approvisionnement motive la recherche de substituts, tels que l'acétate de néodyme (Kuipers et Giepmans 2020), des lanthanides (Nakakoshi et al. 2011) ou encore des phosphotungstates (Sahiro et al. 2022).

La cryo-fixation des phages avant observation en MET peut permettre d'obtenir des images plus nettes, comme le montre la **Figure 10**.

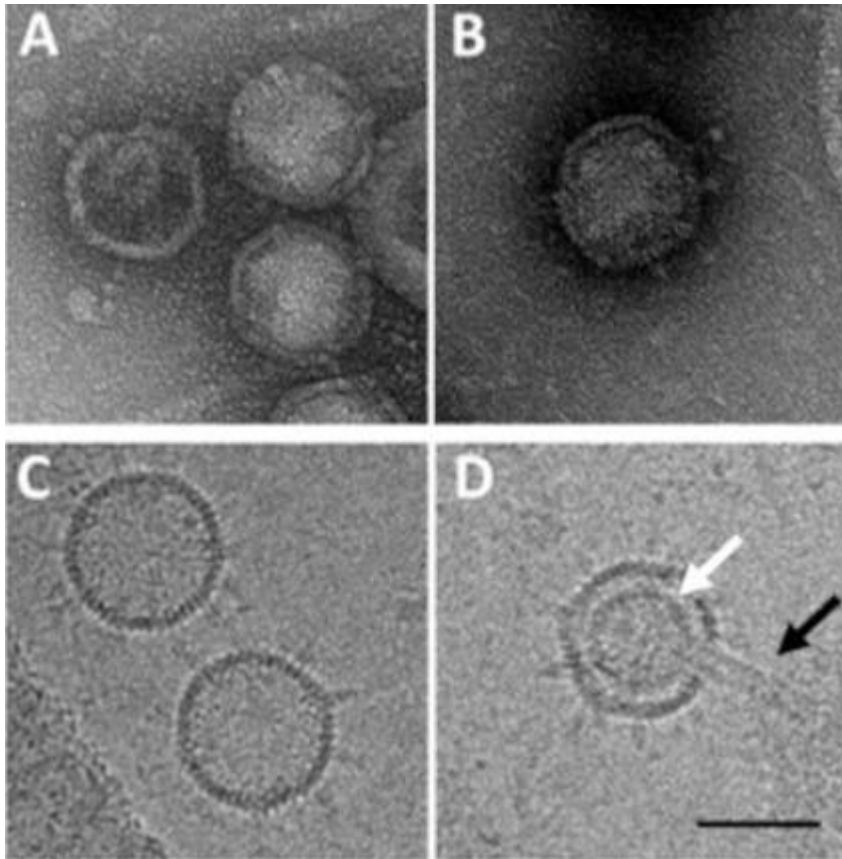


Figure 10 : *Gluconobacter* phage GC1 fixé en coloration négative (A et B) ou cryo-fixées (C et D) (d'après (Chaïb et al. 2020)).

La microscopie à force atomique a pour avantage de donner une image en trois dimensions de l'objet observé, par exemple une bactérie en cours d'infection par un phage (Dubrovin et al. 2008). Elle ne nécessite pas de prétraitements particuliers, qui peuvent dénaturer l'objet observé.

5.2.2. Les paramètres de croissance

La virulence d'un phage se caractérise par différents paramètres :

- la vitesse d'adsorption, qui correspond au laps de temps nécessaire à l'adsorption du phage sur la cellule bactérienne.
- la période de latence, qui correspond à la durée d'infection du phage ; autrement dit, le temps dont il a besoin pour se répliquer.
- la burst size, ou rendement viral par cellule, qui correspond au nombre de virions produits par bactérie infectée.

Ces paramètres peuvent être calculés grâce au suivi d'une infection en culture liquide (one-step growth curve, **Figure 11**). Pour plusieurs de ces paramètres, il faut pouvoir compter les phages, ce qui se fait classiquement par la méthode de la double-couche (Kropinski et al. 2009).

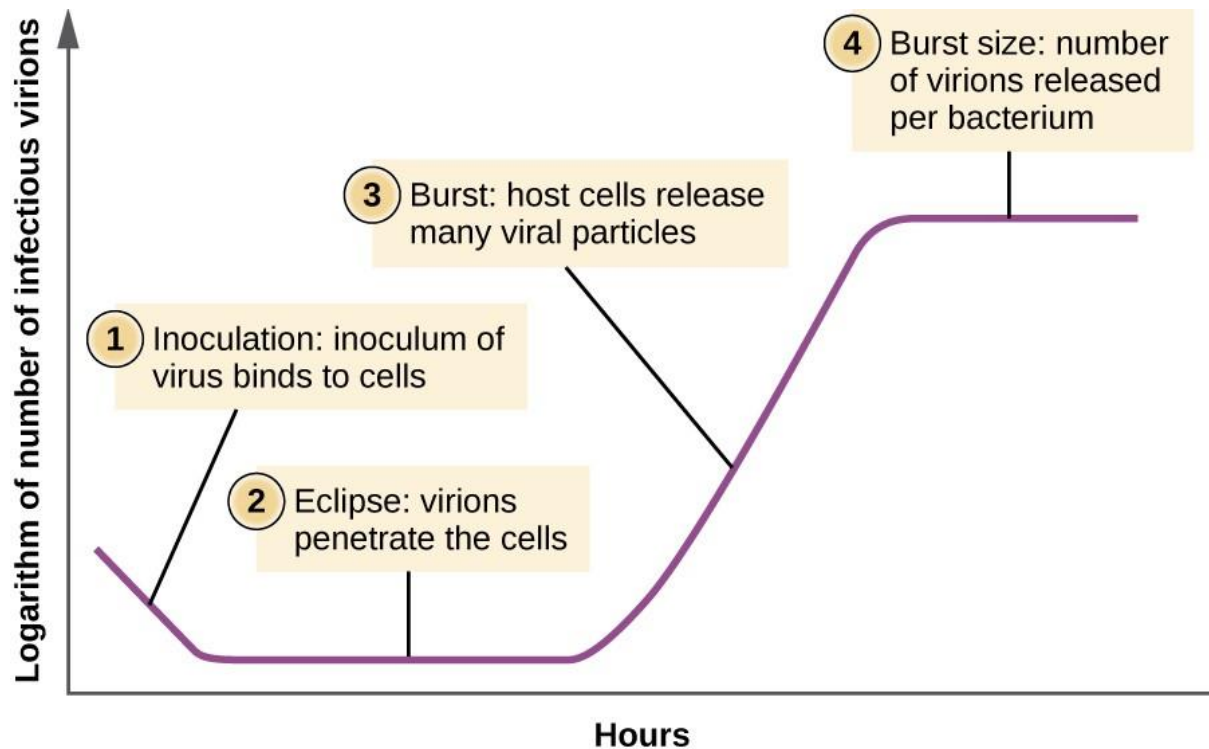


Figure 11 : Cycle de croissance d'un phage (d'après (Course Hero 2022), consulté le 16/11/2022).

2.2.3. Le spectre d'hôtes

Par définition, le spectre d'hôtes correspond à l'éventail de souches bactériennes différentes qu'un phage peut infecter. Il est difficile d'établir précisément ce que signifie un spectre d'hôtes « étroit » ou « large », mais en général il est observé que les phages ont plutôt un spectre d'hôte restreint, c'est-à-dire qu'ils ne sont capables d'infecter qu'une ou quelques souches différentes au sein d'une même et unique espèce (Weinbauer 2004). Ceci s'explique par la grande spécificité de la protéine d'attache du phage pour le récepteur de son hôte. Cependant, il existe aussi des phages généralistes, qui sont capables d'infecter des souches appartenant à différentes espèces, voire à différents genres. Par exemple, le phage S144 est capable d'infecter plusieurs souches de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* et de *Cronobacter sakazakii* (Gambino et al. 2020). Le spectre d'hôte d'un phage s'obtient en testant des dilutions du phage sur un tapis bactérien pur (technique du spot assay sur milieu solide) ou en l'inoculant dans une culture liquide contenant une bactérie unique. La formation de plages de lyse ou la lyse de la

culture (absence de turbidité en culture liquide) indique que la bactérie testée fait partie du spectre d'hôtes du phage.

2.2.4. Séquençage et annotation des génomes de phage

La classification actuelle repose sur le séquençage complet du génome des phages et permet de les organiser taxonomiquement. L'accumulation des données disponibles dans les bases de données permet d'annoter tout ou partie des gènes d'un phage, ce qui donne de précieuses informations sur son mode de vie. Par exemple, repérer un gène codant pour une intégrase dans un génome de phage suggère qu'il est tempéré, bien que ce ne soit pas un critère suffisant pour l'affirmer.

5.3. Les méthodes basées sur la PCR

Lorsque la séquence génomique du phage est connue (complète ou partielle), il est possible de recourir à des méthodes basées sur l'amplification de l'ADN comme la PCR ou la qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) pour détecter, quantifier ou identifier des phages dans un échantillon donné. La PCR permet de détecter et d'identifier un phage. Dans le cas où plusieurs phages sont ciblés, il faut disposer de plusieurs couples d'amorces spécifiques, qui sont utilisés en même temps dans la réaction, qui porte alors le nom de PCR multiplexe. C'est une méthode qualitative. La qPCR permet en plus d'accéder à une information sur la quantité, grâce au suivi en temps réel de la production de l'amplicon au cours des cycles d'amplification et à l'utilisation d'une gamme étalon. Ces dernières permettent ensuite de calculer la concentration initiale du phage ciblé dans l'échantillon analysé.

La PCR multiplexe a par exemple été utilisée pour détecter et identifier simultanément des phages de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, et les trois principaux groupes de phages de *Lactococcus lactis* (936, c2 et P335), dans du lait (del Rio et al. 2007). Des protocoles de détection/suivi de phages de LAB dans des produits laitiers par qPCR sont également largement utilisés. Par exemple, une méthode de qPCR haut-débit qui permet de quantifier simultanément des phages infectant *L. lactis* (phages sk1, TP901-1, P220) et *Leuconostoc* sp. (phage LN04) dans du lait, du lactosérum et des ferments a été développée par (Muhammed et al. 2017).

5.4. La métagénomique virale

Pour obtenir une information plus exhaustive sur la composition de la communauté virale présente au sein d'un échantillon complexe (alimentaire ou non), la métagénomique virale représente actuellement l'approche la plus indiquée (Rosario et Breitbart 2011). Appliquée dès 2002 dans le contexte de l'exploration des communautés virales marines (Breitbart et al. 2002), cette approche consiste à :

- séparer la fraction virale du reste de l'échantillon, ce qui peut être fait par filtration (filtres de porosité 0,22 ou 0,45 μm par exemple).
- extraire les acides nucléiques de cette fraction virale, et les amplifier si nécessaire (en particulier si les quantités initiales de virus dans l'échantillon sont faibles).
- séquencer le matériel génétique par des technologies à haut-débit, par exemple Illumina ou Oxford Nanopore. Plus la profondeur de séquençage utilisée est grande, plus les virus les moins abondants dans l'écosystème ont de chances d'être repérés (Rodriguez-R et Konstantinidis 2014). La plupart des études de métagénomique virale menées jusqu'à présent ont été réalisées en se focalisant sur les virus à ADN db car l'analyse de molécules d'ADN sb et d'ARN nécessite des étapes supplémentaires dans le protocole de préparation des échantillons pour le séquençage (exemple : retrotranscription pour l'ARN) (Krishnamurthy et al. 2016; Benler et Koonin 2021; Callanan et al. 2021).
- nettoyer puis assembler les lectures (séquences obtenues en sortie du séquenceur) en fragments d'ADN génomique viral partiels ou complets, appelés contigs. Avec des assembleurs toujours plus performants, il est ainsi possible de reconstituer de plus en plus de génomes complets au sein des échantillons.
- analyser les contigs produits. Classiquement, leur abondance relative dans l'échantillon est calculée, ils sont identifiés par comparaison aux bases de données publiques, et annotés.

Si de nombreux protocoles, en particulier concernant la purification de particules virales, ont été mis au point à partir d'échantillons variés, ce n'est que très récemment qu'ils ont été adaptés pour la surface du fromage (Dugat-Bony et al. 2020).

La métagénomique virale permet donc d'accéder à des données qualitatives et semi-quantitatives (abondance relative) sur la composante phagique d'un écosystème. Cependant, pour comprendre la place et le rôle des phages dans cet ensemble complexe, il faut les replacer dans leur contexte écologique, en tenant compte de leurs interactions avec les autres microorganismes et des contraintes abiotiques propres au milieu étudié.

Partie IV – Ecologie microbienne du fromage

L'écologie microbienne est la science qui étudie les relations des micro-organismes entre eux et avec leur milieu. Dans ce cas, l'ensemble des micro-organismes est appelé biocénose, et leur lieu de vie biotope. L'association de la biocénose et du biotope définit un écosystème microbien. En suivant cette définition, les aliments fermentés, et en particulier le fromage, sont considérés comme des écosystèmes microbiens. La particularité de ces écosystèmes vient du fait que leur dynamique, depuis un état initial dans la matière première jusqu'à un état stable (appelé climax) dans le produit fini, coïncide avec la fermentation. Il est donc possible de l'étudier dans un laps de temps raisonnable pour l'expérimentateur.

L'équilibre des populations microbiennes du fromage ne cesse d'évoluer tout au long du procédé de fabrication sous l'influence de nombreux facteurs biotiques et abiotiques (**Figure 12**).

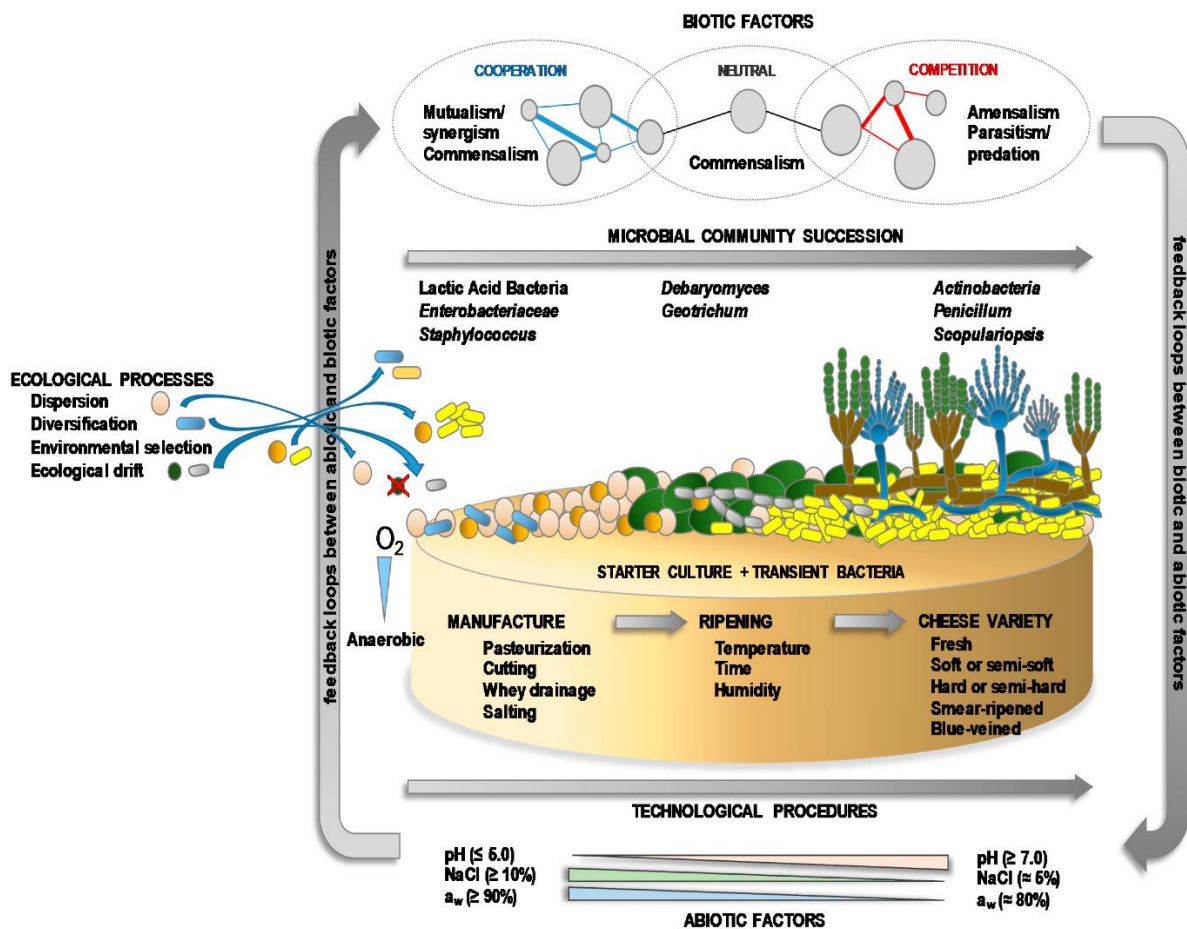


Figure 12 : Les successions microbiennes de la surface du fromage expliquées par l'association des facteurs biotiques et abiotiques (d'après (Mayo et al. 2021)).

1. Les successions microbiennes dans l'écosystème fromager

L'étude de la dynamique microbienne du fromage est généralement réalisée de façon séparée entre le cœur et la surface puisque ces deux compartiments présentent des caractéristiques physico-chimiques très différentes, notamment en termes de pH et d'accessibilité au dioxygène. Le cœur est en effet plus acide et moins oxygéné que la croûte (Montel et al. 2014b). La surface du fromage est un écosystème ouvert aux échanges avec l'extérieur et abrite une communauté microbienne généralement plus diverse que le cœur (Montel et al. 2014b).

Les premiers micro-organismes à se développer dans le lait mis en fabrication sont des LAB, comme *L. lactis* ou *S. thermophilus*. Ces bactéries sont généralementensemencées par le fromager, elles se multiplient très rapidement dans le lait puis le caillé et dominent l'écosystème depuis l'étape d'acidification jusqu'aux premiers stades d'affinage (**Figures 13 et 14**). Elles peuvent ensuite se maintenir tout au long de l'affinage à des concentrations élevées : environ 10^7 UFC/cm² en surface de l'Epoisses par exemple (Irlinger et Monnet 2021). En début d'affinage, les levures et les champignons filamenteux prolifèrent et entraînent la désacidification du caillé. Cette dernière est liée à la consommation du lactate, précédemment produit par les LAB, et à la production d'ammoniac (NH₃) via la dégradation des caséines et des acides aminés (Irlinger et al. 2015b; Fröhlich-Wyder et al. 2019). Ce rôle est par exemple rempli par *Debaryomyces hansenii* et *Galactomyces geotrichum* dans l'Epoisses. Ces seconds acteurs, qui peuvent êtreensemencés de manière dirigée, sont généralement aérobie, acido- et halotolérants, et se développent donc plus facilement en surface du fromage. Au fur et à mesure de la remontée du pH, qui passe progressivement de valeurs comprises entre 4,5 et 5,2 à un niveau situé entre 6 et 8,2 (Mounier et al. 2017), plusieurs espèces bactériennes acido-sensibles et halotolérantes peuvent s'installer. Ce sont principalement des *Actinobacteria* et des *Pseudomonadota*, qui peuvent être regroupées sous le terme de bactéries d'affinage. Dans les fromages à croûte lavée, ces bactéries dominent l'écosystème en fin d'affinage.

Dans l'Epoisses, une analyse de la dynamique des populations bactériennes a été réalisée par une approche de métagénomique ciblant une région du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (metabarcoding) (Irlinger et Monnet 2021). Elle a mis en lumière que la transition entre la dominance des LAB (*Lactococcus* sp. principalement) et celle des bactéries d'affinage (exemples : *Glutamicibacter arilaitensis*, *Psychrobacter* spp., *Halomonas group venusta*) s'opère

à partir du 24^{ème} jour d'affinage, et se poursuit au-delà du stockage des produits (**Figure 14**). Cette transition coïncide bien avec l'augmentation progressive du pH tout au long de l'affinage (**Figure 15**). Les données de dénombrements microbiologiques indiquent qu'entre les deux, *Debaryomyces hansenii* puis *Galactomyces geotrichum* se sont développées (**Figure 13**).

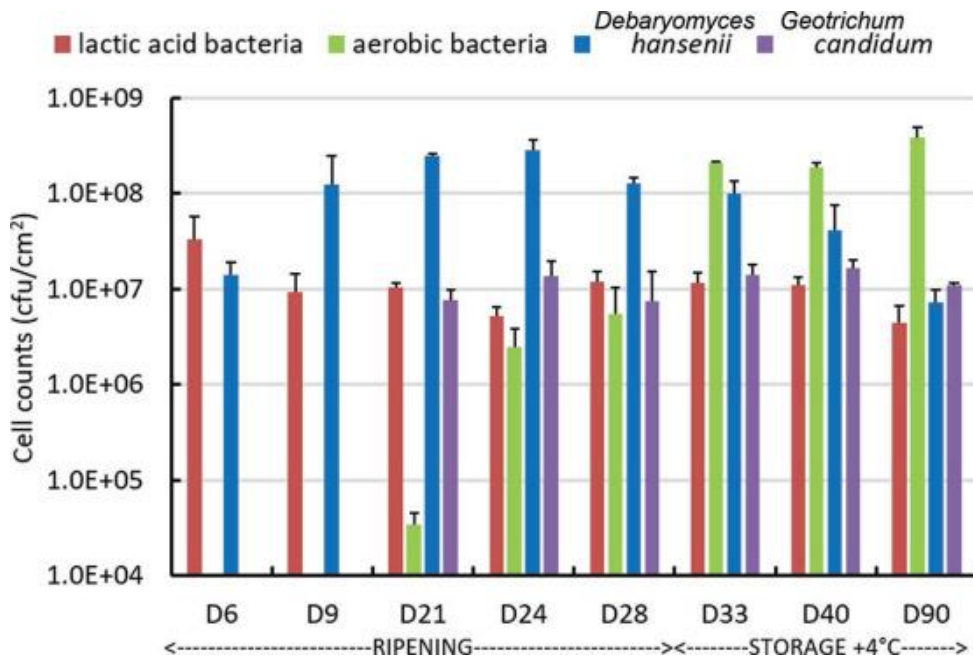


Figure 13 : Dénombrement des bactéries et des levures à la surface de l'Epoisses entre les jours 6 et 90 (d'après (Irlinger et Monnet 2021)).

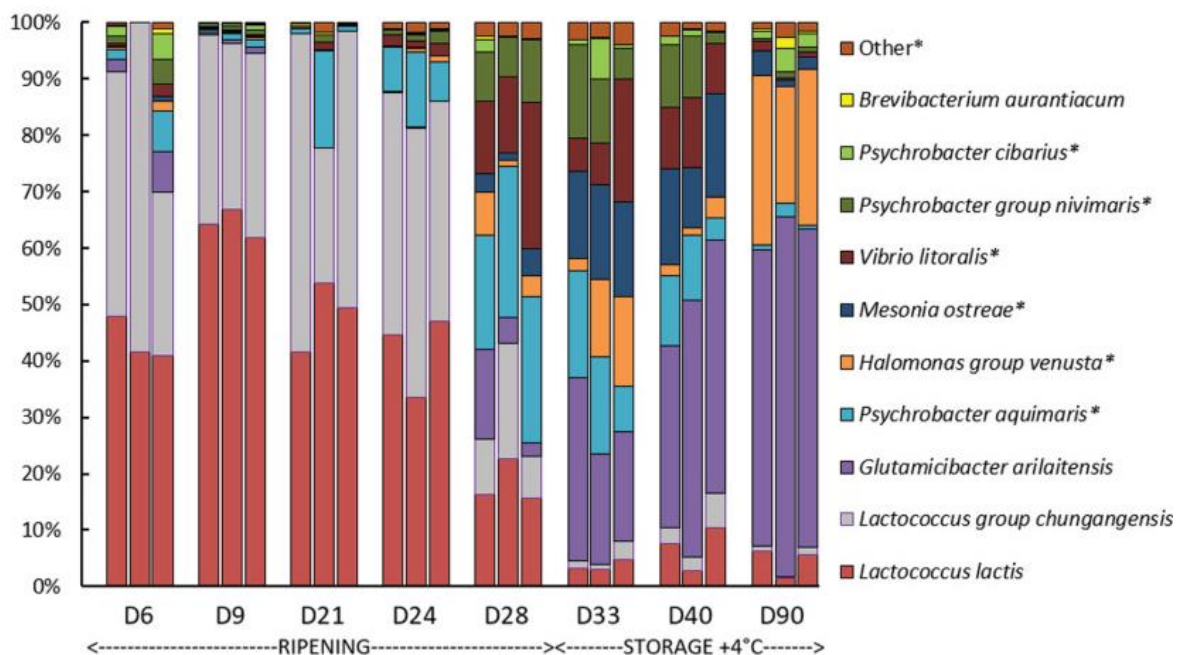


Figure 14 : Abondances relatives des espèces bactériennes à la surface d'un Epoisses en cours d'affinage (d'après (Irlinger et Monnet 2021)).

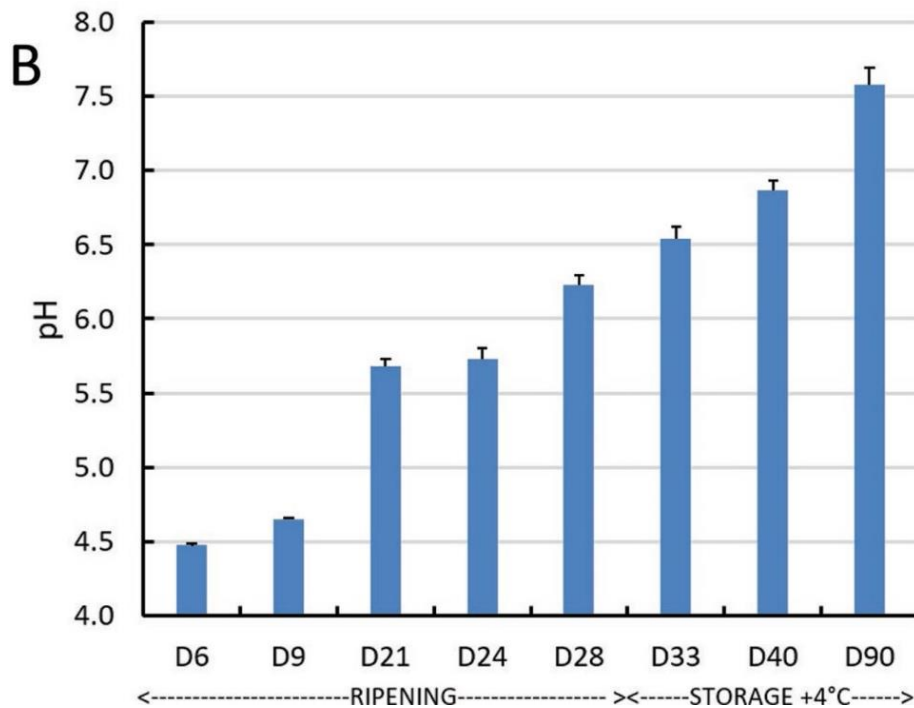


Figure 15 : Evolution du pH à la surface d'un Epoisses au cours de son affinage (d'après (Irlinger et Monnet 2021)).

2. Les principaux facteurs abiotiques

2.1. Le pH

Le pH est l'un des principaux facteurs abiotiques qui permet d'expliquer les successions de populations microbiennes observées au cours du procédé de fabrication du fromage. En effet, il joue un rôle déterminant sur la croissance des bactéries, des levures et des champignons filamenteux. Les micro-organismes peuvent être classés en différentes catégories selon leur profil de sensibilité au pH (**Figure 16**) (Okaiyeto et al. 2013):

- Acidophiles : se développent bien à des pH compris entre 0,1 et 5,4.
- Neutrophiles : se développent bien à des pH compris entre 5,4 et 8
- Alcaliphiles : se développent bien à des pH compris entre 7 et 11,5

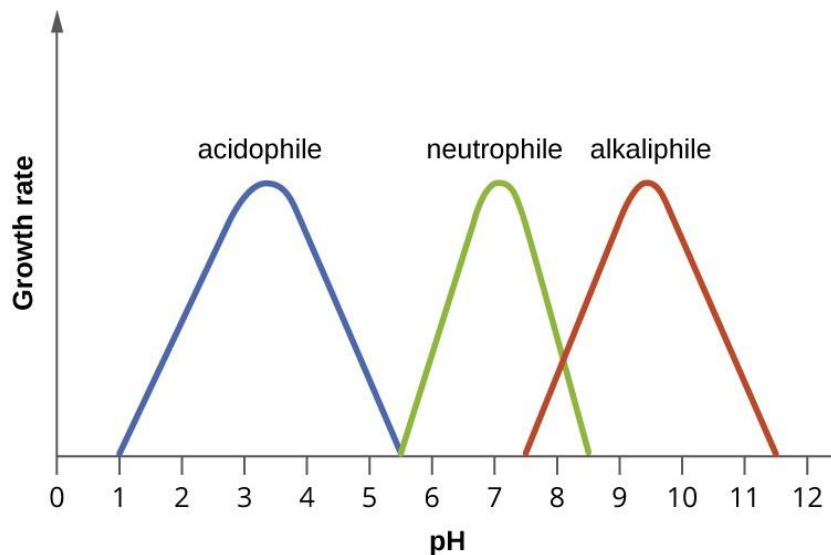


Figure 16 : Taux de croissance de différentes catégories de microorganismes en fonction du pH (d'après (LibreTexts 2020), consulté le 17/11/22).

Les bactéries acido-tolérantes sont capables de se développer en début d'affinage, tandis que les acido-sensibles se développent en fin d'affinage (Irlinger et al. 2015b).

Dans le fromage, les LAB acidophiles comme *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *L. lactis* subsp. *cremoris* se développent en premier, et restent dominantes jusqu'au début de l'affinage. L'action des champignons acido-tolérants, dont *Galactomyces geotrichum*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii* et *P. camemberti* (McSweeney et al. 2017), permet de désacidifier le caillé, et de voir se développer une communauté acido-tolérante (*Staphylococcus equorum*, *S. xylosus* par exemple) puis acido-sensible (*Arthrobacter* sp., *Brevibacterium* sp. et *Corynebacterium* sp.) (Irlinger et al. 2015b). Les alcaliphiles correspondent aux genres *Marinilactibacillus* ou *Alkalibacterium* et arrivent en dernier dans les successions microbiennes (Ishikawa et al. 2007).

2.2. La température

La température est également un paramètre très important pour la croissance des microorganismes. Ce paramètre peut varier sensiblement en fonction du stade de fabrication du fromage notamment au cours des opérations de pasteurisation du lait, de coagulation, de levurage (pour certains fromages de type PMCL par exemple), de chauffage (pour certains fromages de type pâte pressée cuite par exemple), d'affinage ou encore lors du stockage. La température d'affinage choisie dépend aussi de la variété de fromage considérée et des

équipements à disposition du producteur. Par exemple, si une grande majorité de fromages sont affinés dans des hâloirs à température contrôlée, certaines caves d'affinage naturelles ne sont pas régulées en température.

En fonction de la gamme de températures qui convient à leur croissance, les micro-organismes peuvent être classés en plusieurs catégories (**Figure 17**) (Bari et Yeasmin 2022):

- Psychrophiles : leur optimum de croissance est situé entre -5 et 15 °C
- Psychrotrophes/Psychrotolérants : le premier terme est employé par les chercheurs des domaines alimentaires, laitiers en particulier ; le second terme est davantage employé par les chercheurs qui travaillent sur les écosystèmes des environnements naturels. Ces microorganismes ont une température de croissance optimale supérieure à 15 °C (et une température de croissance maximale supérieure à 20 °C) (Moyer et al. 2017).
- Mésophiles : leur optimum de croissance est compris entre 25 et 45 °C
- Thermophiles : leur optimum de croissance est compris entre 45 et 70 °C
- Hyperthermophiles : leur optimum de croissance est compris entre 70 et 110 °C

En général, la coagulation du lait s'opère entre 30 et 37 °C et peut être suivie d'un chauffage du caillé à 37–54 °C pour certaines technologies fromagères (Cotter et Beresford 2017). Le type de ferment lactiqueensemencé est choisi en conséquence : il est ainsi constitué de bactéries mésophiles (*Lactococcus*, certains *Lactobacilli*, *Leuconostoc* (Lucey 2017)) et/ou thermophiles (*Streptococcus thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. helveticus* (Lucey 2017)). La température d'affinage oscille souvent entre 10 et 16 °C. Elle a pour effet de sélectionner préférentiellement des bactéries psychrotrophes, qui peuvent se multiplier à basses températures (Monnet et al. 2015). Les levures et les champignons filamenteux se développent généralement bien à ces températures, comme cela a précédemment été montré pour 7 espèces différentes de *Mucor* (Morin-Sardin et al. 2016). Outre cet effet sur la sélection des micro-organismes, la température d'affinage est également considérée comme un levier important pour accélérer ou ralentir la maturation du fromage. En effet, elle permet de moduler l'expression de certaines fonctions métaboliques par les micro-organismes du fromage comme la protéolyse, la lipolyse, le catabolisme des acides aminés et la production de composés de saveurs (De Filippis et al. 2016).

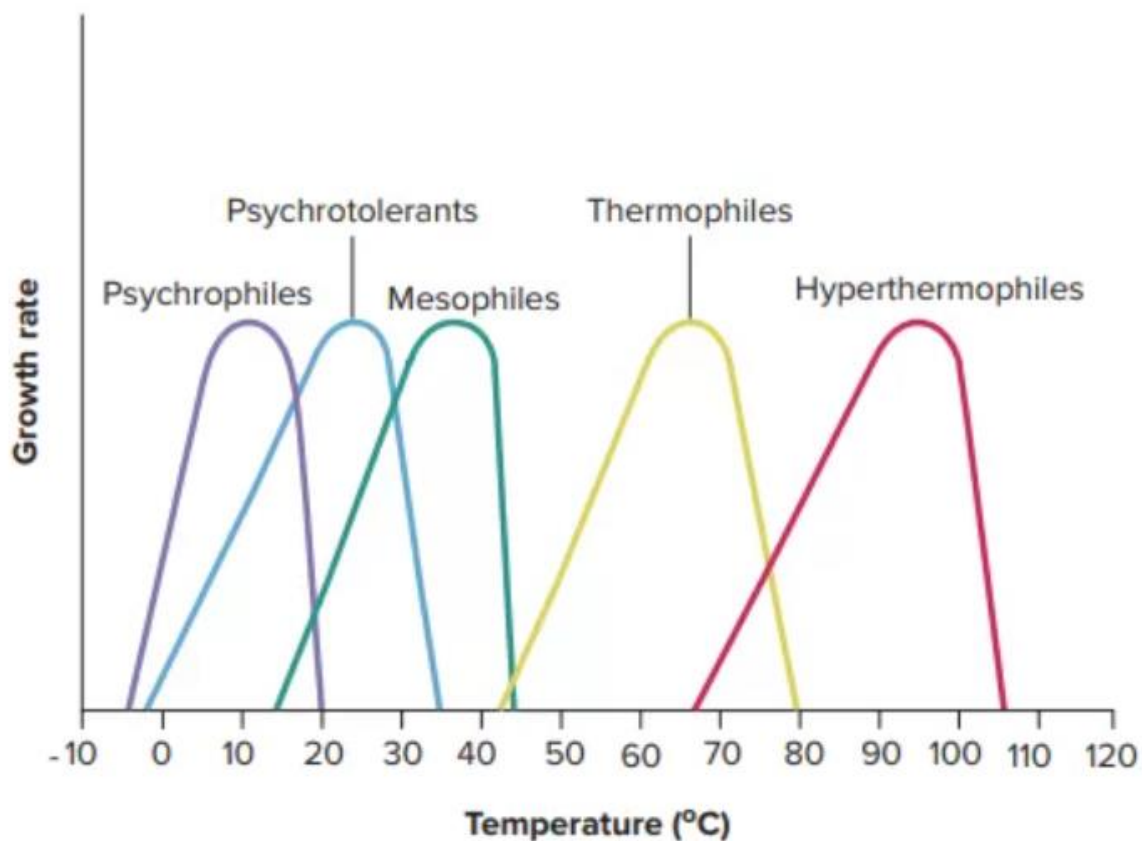


Figure 17 : Taux de croissance de différentes catégories de microorganismes en fonction de la température (d'après (Microbiology Notes 2022)).

2.3. Le sel

Le sel (NaCl) est utilisé en technologie fromagère afin de préserver la qualité sanitaire du fromage en limitant le développement de micro-organismes indésirables tels que des micro-organismes d'altération ou des pathogènes, mais également d'en améliorer la qualité gustative puisqu'il agit comme exhausteur de goût (Doyle et Glass 2010). Il contribue également aux propriétés rhéologiques (texture) des fromages. Suivant le type de fromage considéré, sa concentration varie entre 0.7 et 6% (w/w) dans le produit fini (**Tableau IV**). La concentration en sel à la surface du fromage varie au cours du temps : elle est très élevée après salage (juste après l'immersion dans une saumure par exemple) puis elle diminue progressivement suite à la diffusion des ions sodium vers le cœur (Zhang et al. 2020). Après salage, certains fromages sont lavés avec des solutions d'eau salée au cours de l'affinage (les fromages à croûtes lavées, comme le Munster par exemple).

L'effet antimicrobien du sel s'explique en partie par la diminution de l'activité de l'eau (a_w), c'est-à-dire la quantité d'eau libre contenue dans un aliment. Les micro-organismes ayant besoin d'eau pour se développer, sa séquestration par le sel réduit leur prolifération, ce qui allonge la durée de vie du produit, en plus de le protéger de bactéries parfois indésirables (**Tableau V**) (Bae et al. 2017). Par ailleurs, la présence d'ions sodium augmente la pression osmotique du milieu, ce qui peut ralentir la croissance voire être toxique pour de nombreux micro-organismes (Hickey et al. 2018). Selon leur sensibilité au sel, les micro-organismes peuvent être classés en différentes catégories (**Figure 18**) (Kiki 2016):

- Non-halophiles : se développent bien lorsque le milieu contient moins de 0,2 M de NaCl
- Halotolérants : similaires aux non-halophiles mais peuvent tolérer de hautes concentrations en NaCl
- Halophiles : les halophiles faibles se développent bien entre 0,2 et 0,5 M de NaCl et les halophiles modérés entre 0,5 et 2,5 M.
- Halophiles extrêmes : se développent bien entre 2,5 et 5,2 M de NaCl.

Tableau IV : Caractéristiques typiques de différents fromages (d'après (Guinee et Fox 2017)).

Cheese	Sel (% w/w)
Bleu	4,5
Brick	1,9
Camembert	2,5
Cheddar	1,5
Edam	2,0
Emmental	0,7
Gouda	2,0
Parmigiano reggiano	1,8
Gruyère	1,1
Limburger	2,0
Munster	1,8
Roquefort	3,5
Feta	3,0

Tableau V : A_w minimale requise à la croissance de différents microorganismes (d'après (Guinee et Fox 2017)).

Pathogène	A_w minimale
<i>Shigella</i> spp.	0,96
<i>Yersinia enterocolytica</i>	0,96
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0,94
<i>Pseudomonas</i> spp.	0,95
<i>Escherichia coli</i>	0,95
<i>Clostridium botulinum</i>	0,94
<i>Salmonella</i> spp.	0,94
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,92
<i>Micrococcus</i> spp.	0,87
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86
La plupart des levures et champignons filamenteux	≈0,80
Levures et champignons filamenteux osmophiles	0,55

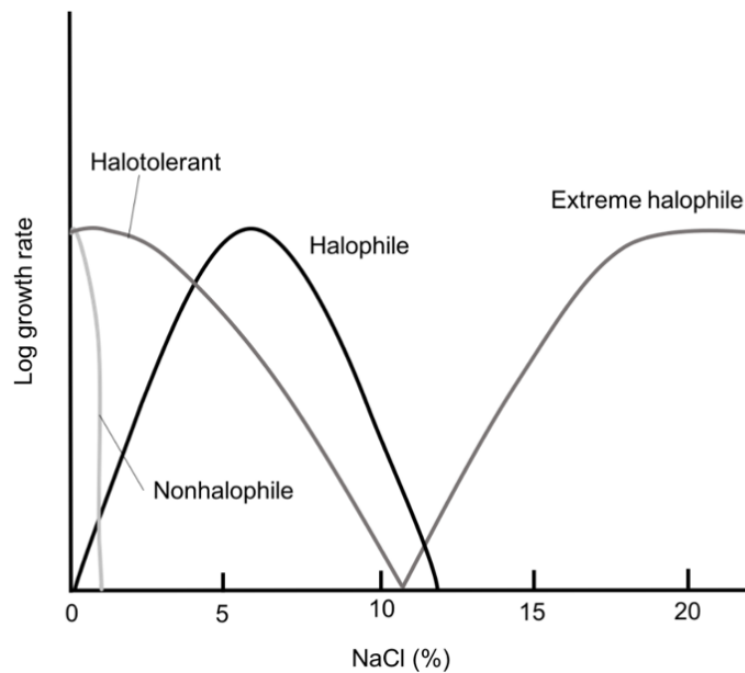


Figure 18 : Catégories de microorganismes en fonction de leur tolérance au sel (d'après (WetLab [sans date])).

Dans le fromage, ce sont surtout les deuxième et troisième catégories qui sont présentes. *Brevibacterium* sp., les NSLAB, les HALAB (pour Halotolerant and Alkaliphilic Lactic Acid Bacteria, qui comprennent les genres *Marinilactibacillus*, *Alkalibacterium*, *Enterococcus*) et les bactéries marines (*Psychrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Halomonas*, *Vibrio*), sont halotolérantes ou halophiles pour la plupart (Mounier et al. 2017). Chez les levures, *D. hansenii* est plus halotolérante que *G. geotrichum* et *Y. lipolytica* (Mounier et al. 2017). Le sel est ainsi utilisé comme outil de sélection pour orienter l'établissement de certaines populations au détriment d'autres.

Du point de vue écologique, une modification du taux de sel peut avoir de fortes conséquences sur l'équilibre de l'écosystème microbien du fromage. Il a par exemple été rapporté qu'une réduction du taux de sel dans le Cheddar entraînait une augmentation de la croissance des ferments lactiques et des NSLAB avec pour conséquence une forte protéolyse et l'apparition de défauts sensoriels comme l'amertume (Rulikowska et al., 2013). Sur des fromages modèles de type pâte molle à croûte lavéeensemencés avec une communauté microbienne réduite, la réduction du taux de sel a conduit à un plus faible développement de la levure *D. hansenii* et à une forte augmentation de la croissance d'*Hafnia alvei* (Dugat-Bony et al. 2016b). Ce déséquilibre a été associé à une modification de la cinétique de protéolyse ainsi qu'à une modification du profil de composés volatils.

2.4. L'humidité relative (HR)

L'ambiance des caves d'affinage est un paramètre contrôlé, puisqu'il empêche le fromage de s'assécher trop vite, et donc de perdre en masse (ce qui est important pour un producteur puisque le fromage se vend au poids). L'humidité relative est même dans les cahiers des charges de certains fromages (voir **Partie I**). La plupart des variétés de fromages sont affinées à une HR comprise entre 85 et 90% (Fox et al. 2017a).

3. Les interactions microbiennes

Dans le fromage, la somme des interactions entre les microorganismes constitue le facteur « biotique » qui régit l'assemblage et la succession des microorganismes.

Au sein d'un écosystème microbien, les différents micro-organismes entretiennent entre eux des relations qui peuvent être positives, négatives ou neutres en termes de « fitness », qui est

le terme employé pour caractériser le degré d'adaptation d'un individu à son milieu. La sélection naturelle tend à perpétuer au sein d'une espèce les génotypes/phénotypes qui possèdent la meilleure fitness, au détriment des autres (Mousseau et Roff 1987), bien que cette « maximisation » de la fitness soit sujette à débat (Birch 2016).

En écologie microbienne, plusieurs types d'interactions ont été décrits (**Figure 19**) :

- Neutralisme : pas d'interaction
- Mutualisme : interaction nécessaire pour survivre dans le biotope ; implique des espèces spécifiques
- Protocoopération : interaction nécessaire pour survivre dans le biotope ; n'implique pas des espèces spécifiques
- Commensalisme : un membre de l'association est bénéficiaire, l'autre est neutre
- Compétition : un organisme essaie d'acquérir un nutriment limitant ; les deux protagonistes sont perdants
- Parasitisme : l'hôte est généralement perdant (fitness réduite ou mort)
- Amensalisme ou antagonisme : les produits d'un membre impactent l'autre négativement

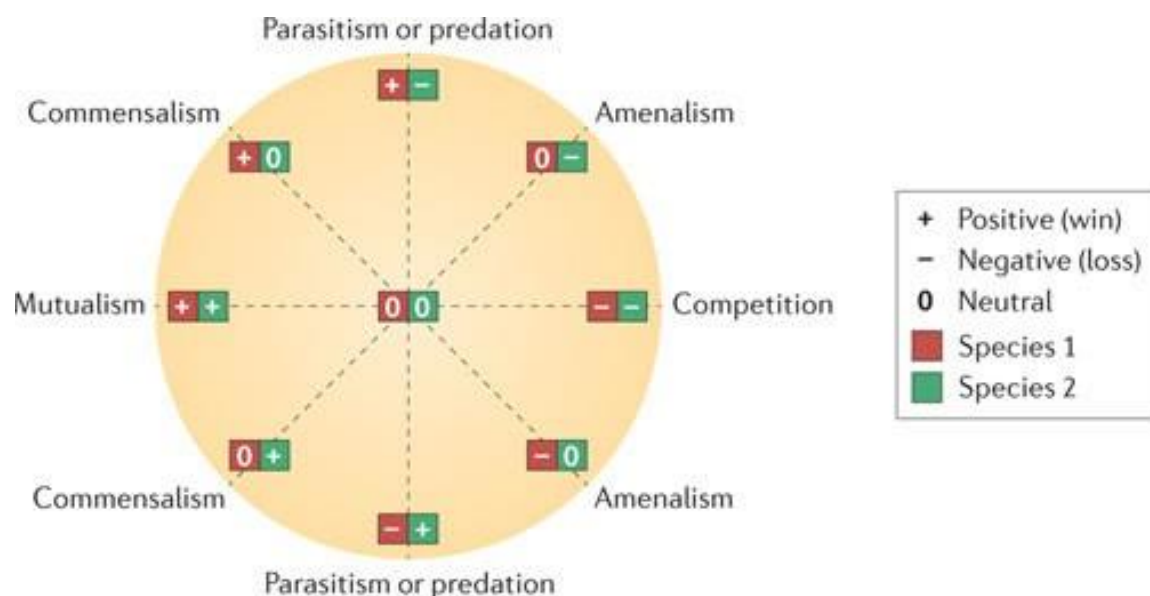


Figure 19 : Les types d'interactions entre individus (d'après (Faust et Raes 2012)).

Dans le fromage, plusieurs de ces interactions ont été observées (Sieuwerts et al. 2008; Irlinger et Mounier 2009) et sont détaillées ci-après.

3.1. La compétition pour les ressources

Dans le fromage, les micro-organismes sont en compétition pour l'utilisation de nombreux nutriments. C'est par exemple le cas pour l'azote qui est présent dans les protéines du lait, majoritairement des caséines. La compétition pour ce nutriment commence dès les premiers stades de la production, puisque les microorganismes (comme *L. lactis*, qui produit des protéases et possèdent plusieurs systèmes de transport des peptides (Juillard et al. 1996)) utilisent les acides aminés libres et les peptides du lait. Au cours du processus d'affinage, la dégradation des protéines (protéolyse) par les bactéries, levures et champignons filamenteux conduit à la libération de petits peptides puis d'acides aminés libres (**Figure 20**).

Certains microorganismes, comme *Corynebacterium casei* et *Microbacterium gubbeenense* sont capables d'utiliser les acides aminés comme seule source de carbone et d'azote, ce qui leur donne un avantage lorsque les autres sources (comme le lactate) s'épuisent en fin d'affinage (Mounier et al. 2007).

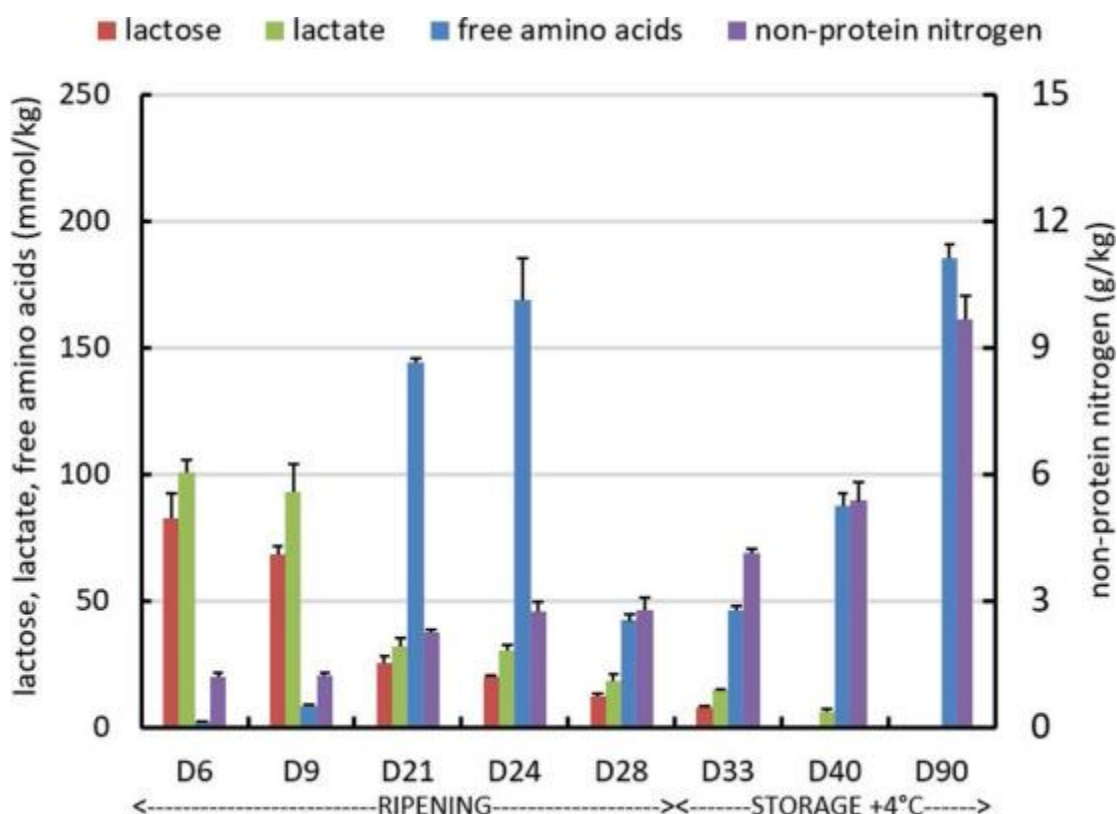


Figure 20 : Disponibilités des ressources en azote dans l'Epoisses (d'après (Irlinger et Monnet 2021)).

Le fer est une ressource considérée comme disponible, mais difficile d'accès pour les micro-organismes dans le fromage et fait également l'objet d'une forte compétition (Monnet et al. 2012). En effet, sa concentration initiale dans le lait est limitée, se situant entre 0,2 et 0,4 mg/l. De plus, le fer se trouve dans cet aliment sous forme complexée avec la lactoferrine, une glycoprotéine présente naturellement dans le lait qui possède une forte affinité pour cet élément, ce qui réduit fortement sa bio-accessibilité pour les microorganismes (Gaucheron et al. 1997; Jenssen et Hancock 2009). Or, le fer est un élément indispensable au développement des bactéries. Pour s'adapter à cette contrainte, les micro-organismes du fromage utilisent différentes stratégies. Chez certaines souches d'origine fromagère, comme *Glutamicibacter arilaitensis* Re117 (Monnet et al. 2010), l'étude des génomes montre une surreprésentation des gènes impliqués dans la synthèse de sidérophores et de leurs transporteurs associés par rapport aux souches isolées d'habitats différents. Les gènes associés à l'acquisition du fer dans les bactéries font partie des plus échangés par transferts horizontaux (Bonham et al. 2017). Les sidérophores sont des molécules (hydroxamates, catécholates, hydroxycarboxylates ou une association de plusieurs composants) de faible poids moléculaire (<1500 Da) qui chélatent les ions fer III. Cette étape de solubilisation est indispensable au transport et à l'assimilation du fer par les microorganismes (Winkelmann 2007).

Récemment, le zinc a également été décrit comme un autre métal peu accessible dans le fromage. Il entre en jeu dans la compétition entre *Glutamicibacter arilaitensis* et *Penicillium* sp. (Cleary et al. 2018). La surproduction de coproporphyrine III par la bactérie en présence du champignon chélate préférentiellement le zinc, ce qui tend à inhiber la croissance de ce dernier, les mécanismes à l'œuvre étant pour le moment inconnus.

3.2. Le commensalisme

Certaines interactions levure-bactérie entrent dans cette catégorie, où la levure donne un avantage à la bactérie. Par exemple, il a été décrit que les levures (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefyr*) sont capables de produire des facteurs de croissance, tels que des vitamines (comme l'acide pantothénique ou vitamine B5), dont les LAB (comme *Leuconostoc mesenteroides*) (Corsetti et al. 2001; Ferreira et Viljoen 2003; Sudun et al. 2013) ou *B. linens* profitent (Purko et al. 1951). La désacidification du caillé par les levures et les champignons filamenteux (souvent *G. candidum* et *D. hansenii*), permettant la croissance des bactéries acido-

sensibles est également un exemple de commensalisme (Callon et al. 2006; Irlinger et Mounier 2009). De même, les bactéries propioniques utilisées dans les fromages à pâtes dures profitent de la production de lactate par les LAB, sans contrepartie (Mayo et al. 2021).

3.3. L'amensalisme

La production de molécules anti-microbiennes, comme les bactériocines, donne un avantage à la bactérie qui les produit (puisque'elle n'est pas sensible à ses propres bactériocines) et peut permettre d'éliminer des espèces concurrentes (Silva et al. 2018). Par exemple, *Lactobacillus* sp. produit des métabolites (acide acétique et diacétyle par exemple) ayant un effet inhibiteur sur *Penicillium commune* et *Mucor racemosus* dans des yaourts et des fromages modèles (Leyva Salas et al. 2019).

3.4. Le mutualisme

Ce type d'interaction, aussi appelé proto-coopération, a été bien décrit dans le fromage. Il a par exemple été proposé que *Brevibacterium aurantiacum*, lorsqu'elle est en co-culture avec *Hafnia alvei*, profite de ses sidérophores, mais qu'en contrepartie, *Hafnia* profite de l'activité lipolytique et protéolytique de *Brevibacterium*, dans une relation mutualiste (**Figure 21**) (Pham et al. 2019).

Certaines souches bactériennes, appartenant par exemple aux genres *Brevibacterium* et *Microbacterium*, ne produisent pas de sidérophores mais sont par contre équipées de transporteurs spécifiques permettant de capter les sidérophores produits par d'autres bactéries ou champignons (*Arthrobacter*, *Corynebacterium*) (Mayo et al. 2021). Ce résultat a été observé sur des souches appartenant au genre *Brevibacterium* : en co-culture, la souche *B. linens* NIZO B1410 produit des sidérophores utilisés par la souche *B. linens* Br5 qui n'en produit pas, et qui voit sa croissance stimulée (Noordman et al. 2006).

Enfin, *Staphylococcus equorum*, qui a pourtant été décrit comme un mauvais compétiteur par rapport aux autres espèces de *Staphylococcus*, est très abondant dans les métagénomomes de croûte de fromage. Lorsqu'il est co-cultivé avec le champignon *Scopulariopsis*, il domine l'écosystème, potentiellement grâce à un accès facilité aux ressources en fer (Kastman et al. 2016).

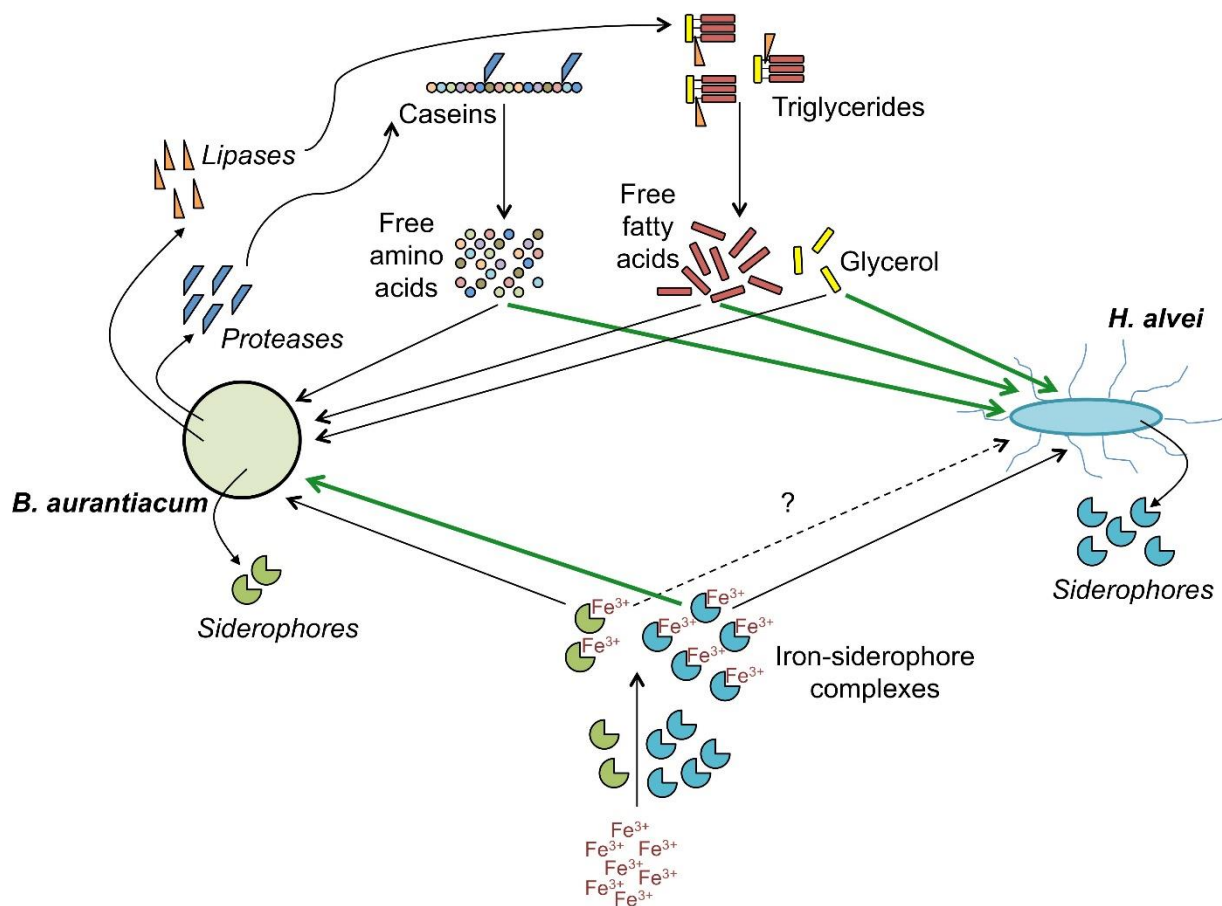


Figure 21 : Mécanismes hypothétiques décrivant la relation mutualiste entre *B. aurantiacum* et *H. alvei*, tiré de (Pham et al. 2019).

3.5. Le parasitisme et la prédation

Il est généralement admis que les interactions champignon-champignon et champignon-bactérie conditionnent l'établissement de l'écosystème de la surface du fromage (Mounier et al. 2009; Lessard et al. 2012; Montel et al. 2014b). Cependant, outre les bactéries, les levures et les champignons filamenteux, un dernier acteur pourrait jouer un rôle dans la mise en place et la dynamique de l'écosystème fromager : les bactériophages. En effet, comme précisé auparavant, les bactériophages sont des parasites obligatoires des bactéries et sont donc capables, à l'échelle d'un écosystème, de réguler l'abondance de certaines populations. L'état de l'art sur la présence de bactériophages dans les aliments fermentés, en particulier le fromage, et leur rôle écologique potentiel est développé dans le **Chapitre 1** de la thèse.

CHAPITRE 1

Les phages dans les aliments fermentés : un facteur
biotique à considérer ?

Avant-propos

Comme relevé dans la synthèse bibliographique, de nombreux exemples d'interactions microbiennes entre les bactéries, levures et champignons filamenteux du fromage ont été décrits dans la littérature concernant l'écosystème microbien du fromage. Cependant, l'impact écologique des bactériophages, qui agissent sur les bactéries en tant que prédateurs/parasites, reste encore en grande partie à explorer. L'assemblage des communautés microbiennes du fromage, leur fonctionnement et leur dynamique ne sont pas toujours bien compris et donc bien maîtrisés. L'étude des bactériophages comme facteur biotique dans l'écosystème microbien fromage pourrait donc apporter de nouvelles connaissances très utiles en technologie fromagère.

Les objectifs de ce chapitre sont d'une part, de faire l'état des lieux sur les connaissances accumulées au sujet des bactériophages des aliments fermentés, dont le fromage, et d'autre part, de se concentrer sur leur possible rôle écologique dans ce type d'écosystèmes, notamment du point de vue de l'assemblage des communautés microbiennes et de leur dynamique. Ainsi, il pose la question de savoir si le phage est un facteur biotique important dans le fonctionnement des écosystèmes, et dans ce cas, quels sont les processus écologiques mis en jeux.

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication sous la forme d'une revue dans le journal « Current Opinion in Food Science » en 2021 (<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.03.007>).

Démarche

Dans un premier temps, la littérature scientifique portant sur les phages des aliments fermentés a été rassemblée afin de dresser un portrait de la diversité et de l'occurrence des phages dans ce type d'écosystèmes. Pour le cas particulier du fromage, l'analyse s'est focalisée sur les phages capables d'infecter d'autres bactéries que les ferments lactiques qui sont déjà largement décrits dans la littérature.

Les principales méthodes permettant d'étudier les phages ou les communautés virales dans les aliments fermentés ont également été exposées.

Une attention particulière a ensuite été portée aux études s'intéressant à la relation entre dynamiques virale et bactérienne dans les aliments fermentés. En effet, l'établissement de corrélations entre les deux est un premier élément permettant d'envisager les bactériophages comme un facteur biotique important dans le fonctionnement d'un écosystème.

Malgré les outils méthodologiques puissants désormais à disposition des chercheurs, comme la métagénomique virale par exemple, le constat a été fait qu'il n'y a à ce jour pas d'études satisfaisantes permettant de correctement décrire le rôle écologique des phages dans les aliments fermentés. C'est pourquoi dans la dernière partie de la revue, dont l'objectif est de recenser les différents processus écologiques par lesquels les phages influents sur la dynamique et le fonctionnement des communautés microbiennes, d'autres écosystèmes ont été considérés.

Bacteriophage ecology of fermented foods: anything new under the sun?

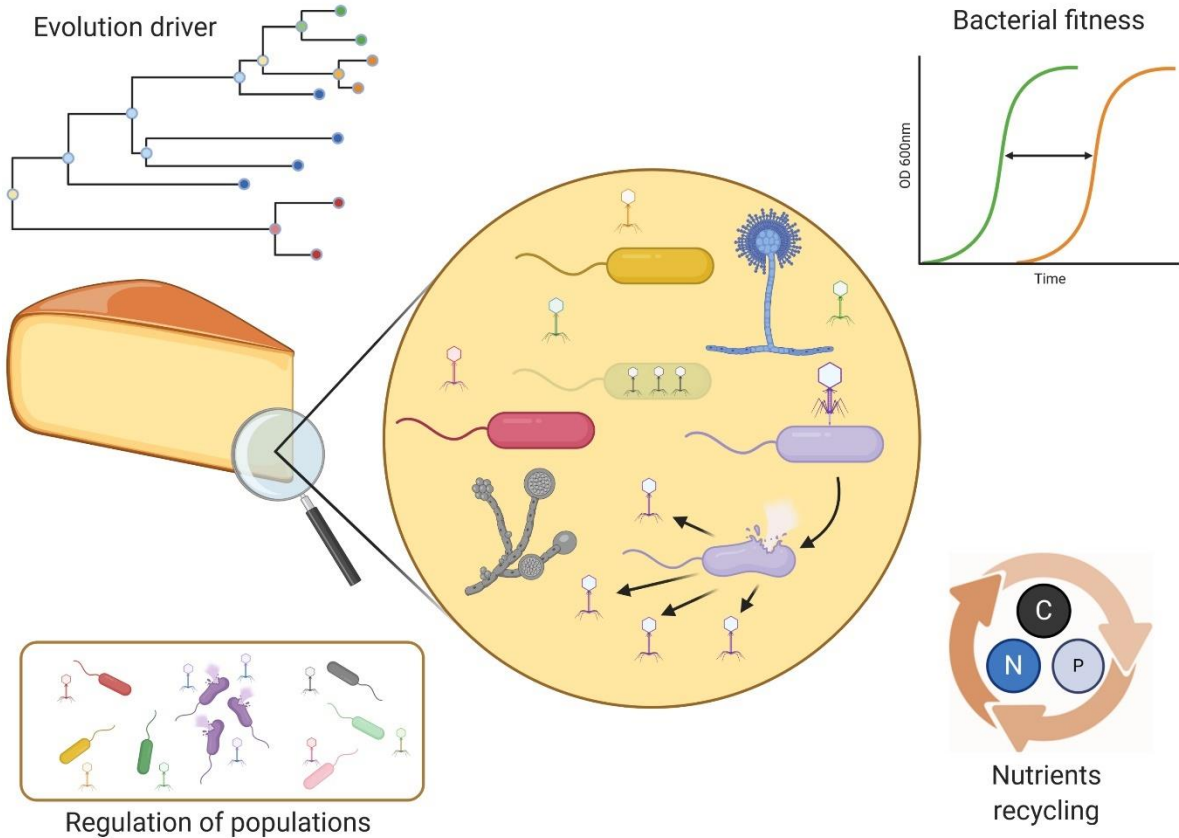
Thomas Paillet¹, Eric Dugat-Bony^{1*}

¹UMR SayFood, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Avenue Lucien Brétignières, 78850, Thiverval-Grignon, France

thomas.paillet@inrae.fr

*Corresponding author: Eric Dugat-Bony (eric.dugat-bony@inrae.fr)

Graphical abstract



Abstract

Bacteriophage ecology has raised an increasing attention over the last few years, thanks to the improvement and contributions of microscopy, comparative genomics and viral metagenomics methods. Fermented foods host dense and diverse microbial communities and, therefore, represent an ideal biotope for bacteriophages. If their occurrence in such environments has been demonstrated decades ago, data highlighting their impact on mixed communities and their ecological roles are scarce when compared to other microbial ecosystems. This review summarizes most recent knowledge into the bacteriophage diversity of fermented foods and stress evidences suggesting the impact of these entities on the dynamics of food microbial communities. The main ecological roles played by bacteriophages in microbial ecosystems are also addressed. Understanding the impact of bacteriophages in fermented foods will further help in designing adapted microbial consortia and thus providing a better control of the food fermentations.

Key-words: fermented foods; bacteriophages; microbial ecology; population dynamics.

Introduction

Fermented foods are widely consumed worldwide and encompass diverse types of products including fermented dairy products, meats, fishes, cereals, legumes, vegetables, seeds, roots and also alcoholic and non-alcoholic beverages [1]. Initially developed with the objective of extending the raw products shelf-life, they are currently also appreciated for their typical sensory properties, nutritional value and potential health benefits [2,3]. Food fermentation relies on the conversion of substrates present in the raw material (e.g. sugars, proteins, lipids) into simpler products such as lactic acid, acetic acid, alcohol, carbon dioxide, ammonia and free fatty acids, through the specific activity of microorganisms.

Fermented foods are dynamic microbial ecosystems, where the succession of several microbial groups occur in a short time, usually from days to weeks or months. This period varies according to the nutrients available in the raw material, abiotic parameters such as temperature, humidity, oxygen and osmotic pressure, and microbial interactions as well [4]. Huge efforts have been performed by the scientific community during the past decades to describe the composition and functioning of food microbial communities, helped by the recent

development of several meta-omics tools [5]. It is now well-established that microbial communities of fermented foods are generally dense (*e.g.* $>10^9$ cells per gram of cheese [6]) and have a low diversity when compared to other microbial ecosystems such as soils [7] or oceans [8]. Bacteria from diverse phyla, *e.g.* *Bacillota* (which includes lactic acid bacteria), *Actinobacteria*, *Pseudomonadota* and *Bacteroidetes*, yeasts and filamentous fungi constitute the main microbial groups involved in food fermentation [9]. Through this fermentative activity, they contribute to the quality of the food products in several ways, *i.e.* by preventing the development of pathogens, modifying the texture, releasing aroma compounds or degrading anti-nutritional factors.

Bacteriophages (phages), viruses that infect bacterial cells, are considered as key ecological drivers in the functioning of microbial ecosystems [10]. Indeed, phage-bacteria interactions can potentially affect the balance between the different functional groups of microbes and then (re-)shape microbial communities. In the human gut, where phage particles probably do not outnumber bacteria, phages could play a transitory role in the homeostasis or the evolution of the microbiota [11]*. In food fermentations, although the presence of bacteriophages has been demonstrated around one century ago [12], only few examples of deep inventory of their diversity are available and the literature about their ecological role is even rarer.

The present review summarizes the current knowledge on the occurrence and diversity of bacteriophages in fermented foods, especially in light of the recent discoveries resulting from the analysis of viral metagenomics data. It also discusses the possible ecological roles played by these biological entities in the fermentation process, as they may determine its success or failure.

Current knowledge on bacteriophages' occurrence and diversity in fermented foods

Several experimental approaches have been used for enumerating bacteriophages in microbial ecosystems and exploring their diversity. Some of them require the isolation of phages, which implies as first steps to identify and cultivate susceptible bacterial hosts, while others can be applied directly on environmental samples (**Figure 1**).

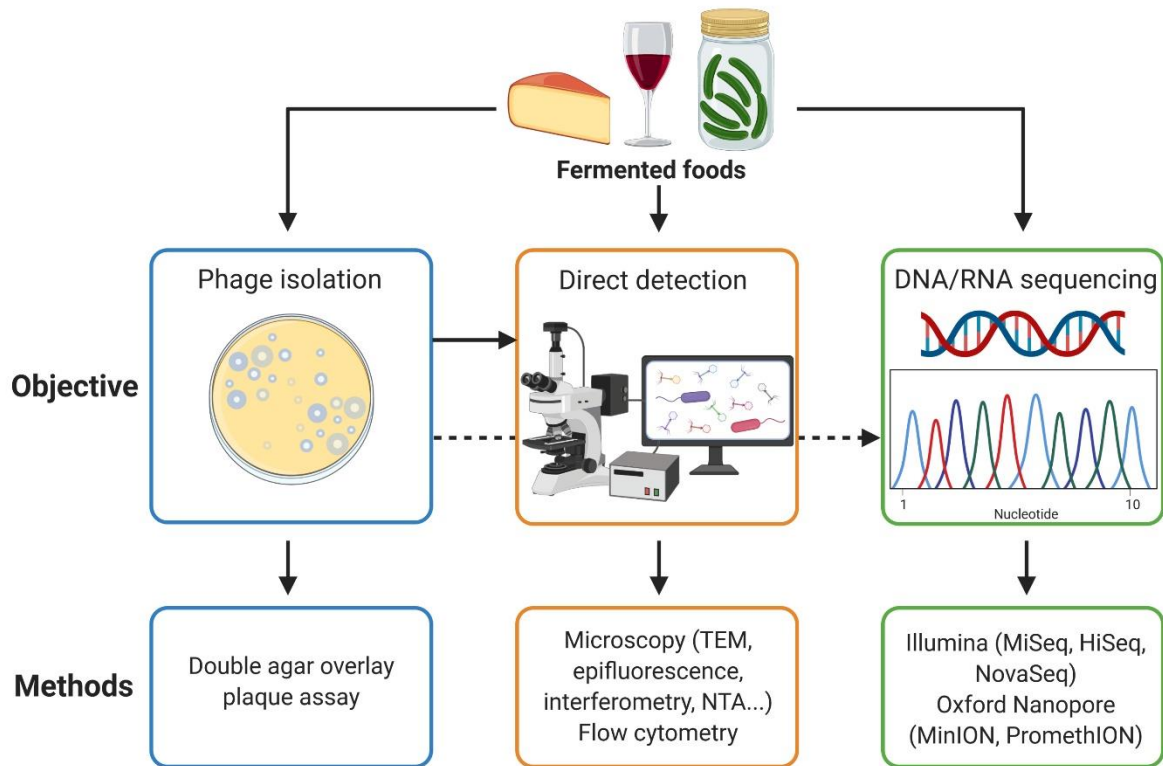


Figure 1: General methods for the study of bacteriophages in fermented foods.

Culture-dependent approaches

The presence of bacteriophages in fermented foods was frequently investigated by culture-dependent approaches. In practice, the main technic consists in collecting phages from a liquid sample obtained from the food product, or from a suspected reservoir in the manufacturing environment, and putting them into contact with a sensitive bacterial strain on a double-layer agar plate (for a detailed protocol, see [13]). It is also possible to directly enumerate phages to determine their initial level in food products [14], or to enrich them before isolation to enhance the probability of recovery [15].

Once isolated, phages can be further identified and characterized by applying a variety of downstream analysis. The historical classification of bacterial viruses is based on electron microscopy (EM) observations [16], and it is now progressively moving to a molecular classification. In Philippe *et al.*, the authors used EM for the morphological characterization of phage GC1 isolated from wine musts [17]. They observed tail-less icosahedral particles, meaning that this phage did not belong to *Caudovirales* order. A further characterisation of its genomic properties determined that GC1 belongs to the *Tectiviridae* family.

In most recent articles, genome sequencing and comparative genomics were also applied to phages isolated from fermented foods. De Melo *et al.*, made comparative genomics on 18 *Brevibacterium aurantiacum* phages isolated from cheese [18]**. They were classified into 7 distinct genomic groups based on the number of DNA tandem repeats (TRs) in each genome. They also found that 85% of phages in databases possessed such TRs. Similarly, Cheng *et al.*, classified 7 *Propionibacterium freudenreichii* phages into two clusters, based on the nucleotide identity and coverage percentage between each genomes [15].

In most cases, such a culture-dependent approach also gives clues as to whether the isolated phage is temperate or virulent, by confronting the aspect of plaques (turbid for temperate, and usually clear for virulent [19]) and the genetic analysis of the complete genome (which generally contains an integrase when the phage is temperate).

As summarized in **Table 1**, both virulent and temperate phages were isolated from many fermented foods. Most of them are *Siphoviridae* and *Myoviridae* but *Podoviridae* and *Tectiviridae* were also isolated occasionally [14,17,20]. Exceptionally, filamentous phages were also isolated from this type of products [21]. The hosts are usually members of the dominant species present in the corresponding food, such as *Leuconostoc mesenteroides* in Sauerkraut [22] or *Oenococcus oeni* in Wine [23]. For the particular case of cheese, where an abundant literature regarding phages infecting Lactic Acid Bacteria (LAB) starter cultures is available, as reviewed previously [24,25], only a few studies described the isolation of phages infecting other important bacteria such as *Propionibacterium freudenreichii* [15,21], the bacteria responsible for the production of holes in Emmental-type cheese, *Brevibacterium aurantiacum* [18], a surface ripening culture used in many cheese varieties and *Enterococcus faecalis* [26,27]*.

Table 1. Selected examples describing the isolation of phages directly from fermented foods.

Fermented food	References	Phage families	Type	Host
Cheese*	[15]	7 <i>Siphoviridae</i>	Virulent	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
	[18]	16 <i>Siphoviridae</i>	Virulent	<i>Brevibacterium aurantiacum</i>
	[21]	<i>Siphoviridae</i> and <i>Inoviridae</i>	Temperate and filamentous	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
	[26]	1 <i>Myoviridae</i>	Virulent	<i>Enterococcus faecalis</i>
	[27]	1 <i>Siphoviridae</i>	Virulent	<i>Enterococcus faecalis</i>
Fermented Cucumber	[80]	1 <i>Siphoviridae</i>	Virulent	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	[81]	3 <i>Siphoviridae</i> and 3 <i>Myoviridae</i>	N.D	<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Weissella paramesenteroides</i> , <i>Weissella cibaria</i>
	[82]	1 <i>Siphoviridae</i>	Virulent	<i>Pediococcus</i> sp.
Fermented Soybean	[83]	N.D	Virulent and temperate	<i>Bacillus subtilis</i>
	[84]	16 <i>Siphoviridae</i>	N.D	<i>Bacillus cereus</i>
	[85]	1 <i>Myoviridae</i>	N.D	<i>Bacillus cereus</i>
	[86]	1 <i>Siphoviridae</i> and 1 <i>Myoviridae</i>	N.D	<i>Pediococcus halophilus</i>
Kefir	[87]	2 <i>Siphoviridae</i>	N.D	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Kimchi	[20]	1 <i>Podoviridae</i>	N.D	<i>Weissella cibaria</i>
	[50]	N.D	N.D	<i>Weissella cibaria</i> , <i>Leuconostoc citreum</i>
	[88]	1 <i>Siphoviridae</i>	N.D	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Salami	[89]	2 <i>Podoviridae</i>	N.D	<i>Staphylococcus carnosus</i>
Sauerkraut	[90]	3 <i>Siphoviridae</i> and 3 <i>Myoviridae</i>	N.D	<i>Leuconostoc fallax</i>
	[91]	5 <i>Siphoviridae</i> and 3 <i>Myoviridae</i>	N.D	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc citreum</i> , <i>Leuconostoc fallax</i> , <i>Weissella</i> sp.,

				<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i>
	[22]	1 <i>Siphoviridae</i>	Virulent	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	[92]	2 phages	N.D	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	[93]	2 <i>Myoviridae</i> 'type 1', 5 <i>Myoviridae</i> 'type 2' and 2 <i>Siphoviridae</i>	N.D	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>
Sourdough bread	[94]	9 <i>Siphoviridae</i>	3 virulent and 6 temperate	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	[95]	1 <i>Siphoviridae</i>	Virulent	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
Wine	[96]	11 <i>Siphoviridae</i>	N.D	<i>Oenococcus oeni</i>
	[14]	<i>Siphoviridae</i> , <i>Myoviridae</i> , <i>Tectiviridae</i>	N.D	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Oenococcus oeni</i>
	[23]	15 <i>Siphoviridae</i>	Temperate	<i>Oenococcus oeni</i>
	[97]	4 <i>Siphoviridae</i>	N.D	<i>Oenococcus oeni</i>
	[98]	2 <i>Siphoviridae</i>	N.D	<i>Oenococcus oeni</i>
	[99]	1 <i>Siphoviridae</i>	Virulent	<i>Oenococcus oeni</i>
	[100]	17 <i>Siphoviridae</i>	N.D	<i>Oenococcus oeni</i>
	[17]	1 <i>Tectiviridae</i>	Temperate	<i>Gluconobacter cerinus</i>
	[101]	17 <i>Siphoviridae</i>	Temperate	<i>Oenococcus oeni</i>

N.D = Not Documented.

*For cheese, no example describing the isolation of phages infecting LAB starter culture is listed since the literature on such phages is extremely abundant and already reviewed [24,25].

However, in the perspective of understanding the bacteriophage ecology in fermented foods, single phage isolation suffer from the major limitation of the culture-dependent approach that is the need of a susceptible host. By definition such approach cannot accurately reflect neither the bacterial and viral diversity present in fermented foods, nor their relative abundance. It is however very efficient from a technological point of view, for example in the case where a phage is suspected to be responsible of a fermentation failure and needs to be quickly identified.

Direct detection approaches

An alternative is to detect and/or quantify phages directly in food samples or in a viral fraction extracted from food samples without *a priori* knowledge on the bacterial host(s). Several techniques are available to count or observe viruses directly in complex samples [28], such as flow cytometry [29], epifluorescence microscopy [30], nanoparticle tracking analysis [31], interferometric light microscopy [32] and electron microscopy including Scanning Electron Microscopy (SEM) [33], Transmission Electron Microscopy (TEM) [34] and cryo Electron Microscopy (cryo-EM) [35].

Only few studies used such direct approaches to characterize the phage communities of fermented foods. Dugat-Bony *et al.*, used interferometric light microscopy to determine the phage concentration on the surface of three cheese varieties and found that it ranged from 1×10^9 to 4×10^{10} particles per gram at least [36]*. They also observed different morphotypes on Epoisses cheese with TEM, giving first indications about the complexity of phage communities present on the cheese surface.

As a complement to their metagenomic study, Park *et al.*, used TEM on samples from shrimps, sauerkraut and kimchi, after a cesium chloride (CsCl) density gradient purification step [37]. They were able to characterize various phages morphologies, mainly *Sipho-* and *Myoviridae*.

To summarize, in the context of fermented foods, direct detection approaches can provide rapidly important ecological information such as total phage's concentration and rough elements about their diversity. However, since many bacteriophages can share similar morphological traits, techniques offering more precision are desirable to properly describe the composition of phage communities in fermented foods.

New contributions of whole metagenome sequencing and viral metagenomics

Two main categories of metagenomics approaches have been used to detect viral signals from environmental samples.

First, whole metagenome sequencing, which generates randomly sequences from the whole microbial ecosystem, can contain viral sequences if free viruses are not lost during the sample preparation. It can thus be used to identify abundant phages present in microbial ecosystems

using dedicated bioinformatic tools [38,39]. Regarding fermented foods, only two studies analysed the presence of phage sequences in metagenomic datasets. In kimchi [40], the authors identified four putative phage contigs with sequence similarity with the genome of LAB-phages. In kinema, a fermented soybean product, the viral community was dominated by phages infecting *Bacillus* species. Their identity was further confirmed by taxonomic analysis, and they all had one or several well-characterized host(s) [41].

Secondly, viral metagenomics, or “viromics”, consist in extracting and sequencing the genomic material of the viral community selectively purified from an environmental sample (*e.g.* food products, natural environment, host-associated) [42]. This approach is designed to obtain a deep overview of the composition of the phage community present in a given ecosystem. Generally, only dsDNA phages are sequenced, leaving a grey area regarding RNA and ssDNA phages, whose quantities and diversity are probably underestimated thus far [43]. In natural ecosystems such as ocean, or soils, numerous viral metagenomic studies targeting phages have been carried out (respectively, [44] and [45,46]). However, they are scarce when it comes to fermented foods or fermented beverages, as reviewed in [47].

Park *et al.* firstly analysed the metavirome of fermented shrimp, kimchi and sauerkraut [37]. Viral particles were recovered and concentrated from the food samples by using filtration and ultracentrifugation prior to viral DNA extraction and pyrosequencing. The results revealed an important diversity in phage sequences, most of which showing no significant hits in public databases, and 6 to 27 contigs >5 Kb per food sample were assembled. Major discrepancies were observed between predicted hosts and the actual bacterial diversity detected in kimchi and fermented shrimp, reflecting the fact that viral genomes of these fermented foods were poorly represented in public databases at the time of the study, so that host predictions probably failed. On the contrary, phage host predictions in sauerkraut were reliable, thanks to the availability of several phage genomes isolated in previous work [22].

The viral community from ten samples representative of Korean and Chinese kimchi was also investigated [48]. Viral concentrates were obtained through filtration followed by Polyethylene Glycol (PEG) concentration, and DNA was sequenced providing several thousands of contigs >500 bp per sample, and revealing a very high diversity. The phage host prediction was

consistent with the bacterial diversity and, interestingly, viral community profiling was found to outperform bacterial community profiling for predicting the geographical origin of kimchi.

Recently, the first metavirome of the cheese surface was described [36] using Epoisses cheese as an example. The viral fraction was obtained according to an optimized protocol involving filtration, PEG concentration and chloroform treatment. DNA sequences were assembled into 124 viral contigs from 2.5 to 122 kb, highlighting the presence of an unexpected viral diversity in this ecosystem. The authors were able to predict a bacterial host for the most abundant ones, namely *Glutamicibacter*, *Lactococcus*, *Psychrobacter*, *Vibrio*, *Leuconostoc* and *Halomonas*, which were previously detected as dominant bacterial genera in Epoisses cheese [49].

Overall, available data suggest that fermented foods host dense and complex phage communities, at least as diverse as bacterial ones. However, despite the growing descriptive data available regarding bacteriophages occurrence and diversity in fermented foods, there is still a gap before demonstrating that these entities play an ecological role in this environment and can impact food fermentations.

Relationships between viral and bacterial dynamics

The first step would be to determine if a relationship exists between the levels of viral and bacterial populations during the fermentation cycle. For fermented foods, few studies demonstrated such correlation.

In kimchi [40], the monitoring of the composition of bacterial and phage populations during 29 days of fermentation was achieved by using a whole metagenome sequencing approach. The relative abundance of the four identified phage contigs increased during the fermentation cycle, reaching ~7% of the total metagenomics sequences after 25 days. This large number of sequences was correlated to the decrease of bacterial population observed after 25 days suggesting that bacteriophages may influence the microbial community dynamics in this product.

Recently, Kong and Park used a culture media made from sterilized supernatant of dongchimi kimchi (a watery kimchi made from radish, green onions, garlic, ginger and salt) to perform co-culture of the main LAB species involved in the fermentation of this product, *i.e.* *Leuconostoc*

citreum, *L. mesenteroides* and *Weissella cibaria* [50]*. They used different combinations of strains, sensitive to phages or not, and followed the dynamic of both bacterial and phage populations by culture-dependent methods over 10 days. They observed a negative relationship between the abundance of phages and the viability of their hosts, independently of the pH of the medium, highlighting the impact of bacteriophages on the succession of LAB species during dongchimi kimchi fermentation.

Finally, Erkus *et al.* studied an undefined complex cheese starter culture, composed of several strains of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* grouped in eight different genetic lineages, some of which carrying active prophages [51]. In one of the described experiment, they propagated *in vitro* the culture daily in milk during several weeks, mimicking the back-slopping procedure used in the dairy industry, and followed temperate phage population by titration and the different bacterial lineages by qPCR. The results indicated that although some strains can undergo dramatic decrease in abundance at certain stages of propagation, due to the increase in a particular phage population in the medium, the effect on the relative abundance of the genetic lineage they belong to was very limited, ensuring an overall stability of the community structure, both regarding genes and functionalities.

To summarize, there are increasing evidences that bacteriophages affect the dynamics of food microbial communities during fermentation. The impact of phage attacks on the overall structure and function of microbial communities is thought to depend on the complexity of the studied system and microdiversity seems to play an important role in the overall stability of microbial communities in fermented foods.

Ecological roles of bacteriophages

Studies elucidating the ecological roles of bacteriophages occurring in fermented foods are scarce. Thus, this section summarizes the main roles attributed to these entities regardless of the microbial ecosystem of origin. It is likely that major results observed within natural ecosystems are transferable to fermented products.

Direct regulation of bacterial populations

Bacteriophages may have several types of behaviours toward their bacterial hosts (Box 1). They can directly impact the population levels of their hosts in different ways and, consequently, the whole community structure.

First, phages performing a lytic cycle, which encompass professionally lytic, virulent mutant (or ex-temperate, see [52]) and temperate phages entering a lytic cycle, foster a prey-predator relationship with their host. Since bacteriophages are non-motile entities, the probability of encountering a host cell and starting infection strongly depends on the host's density. In mixed microbial communities, this means that bacteriophages kill the sensitive bacterial strain(s) with the highest density, as theorized in the Kill-the-Winner [53] and seed-bank models [54,55], while having a little impact on the total microbial biomass. This direct effect also promotes bacterial diversity since several bacterial populations sharing the same ecological niche can coexist [56] and grow in a sequential manner. Finally, it also favours the optimal utilisation of all resources present in the ecosystem, as a single dominant bacteria wouldn't have the necessary enzymatic equipment to exploit all the available nutrients [57].

Second, temperate phages can also affect the fitness of their host when entering a lysogenic cycle. When integrated as prophages into the bacterial host genome, they can develop either a parasitic or a mutualistic interaction with their host. Building on the comparison between *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403 and a prophage-cured derivative of the same strain, Aucouturier *et al.* [58]* demonstrated contributions of resident prophages on host physiology and adaptation capacity, through the modulation of antimicrobial resistance, growth rate, survival, or host-sensitivity to virulent phages. Similarly, Costantini *et al.* [23] observed that, among sixteen *Oenococcus oeni* strains used for malolactic fermentation in wine, the ones integrating one or several prophages in their genomes were more resistant to the predation by other oenophages.

Finally, bacteriophages which cannot enter a lysogenic cycle and are producing virions in a chronic fashion without cell lysis interact with their host through a parasitic relationship. In this case, the main expected effect would be a lower fitness of the host caused by the energy cost required for the bacteriophage's replication but this was not studied in the context of fermented foods to our knowledge.

In addition to the regulation of the population level of their hosts, bacteriophages can also prompt substantial modifications of the bacterial transcriptome and proteome and, hence, affect their metabolism [59].

Indirect effects on non-host populations

Bacterial lysis mediated by bacteriophages is responsible for the release of organic matter into the environment. In ecology, this phenomenon is known as the “viral shunt” and it affects trophic webs by lowering bacterial biomass before it is assimilated at higher trophic levels [60]*. Bacterial lysis provides an important source of free nutrients which can support and promote the growth of other microorganisms. It has thus a large impact on microbial dynamics and densities.

For example, Fazzino *et al.* studied the effect of virulent bacteriophages on the mutualistic interaction between *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* [61]**. In such cross-feeding model community, phages can have extensive indirect effects affecting the bacterial community dynamics. One of those indirect effects was the release of organic matter since the growth of *S. enterica* was stimulated by the lysis of *E. coli* by phage T7.

In fermented foods, such phenomenon is likely to occur. However, contrary to other natural ecosystems, the trophic chain is short and there is generally no upper trophic level above heterotrophic microorganisms. In this case, the role of the viral shunt encompasses probably only the release of cellular debris and intra-cellular compounds, providing additional resources for non-hosts species. In line with this suspected role, Kong & Park experimentally evidenced that a bacteriophage lysate of *Weissella cibaria* can promote the growth of *L. citreum* in kimchi fermentation [50].

Phages as bacterial evolution drivers

Bacterial viruses represent a continuous selective pressure on bacteria, driving them to evolve by selecting antiphage defence mechanisms [62]*. In response, phages adopt strategies to overcome host defence systems. This antagonistic co-evolution is a kind of perpetual arms race, referred to as the Red Queen dynamics [63]. It is due to the extremely rapid evolution and turnover of phage particles [64], increasing mutation rates in their host(s) [65], driving neither the predator nor the prey to extinction. The most prominent outcome of this interaction is ecological speciation, resulting in a high microdiversity of both hosts and phages.

Horizontal gene transfer (HGT), which refers to the incorporation by an organism of genetic material from another organism that is not its parent, contributes to the microbial genome evolution [66]. Bacterial lysis due to the phage progeny release is accompanied by the release of intra-cellular components into the environment and especially pieces of DNA-that could be acquired by other bacteria through natural transformation [67]. HGT can also happen through transduction (generalized or specialized [68]), when a bacteriophage accidentally packages bacterial DNA and transfers it to another host.

Lysogeny has been suggested as a survival strategy when the environment contains low host densities [69]. Prophages integrated in a host bacteria are usually in a dormant state, as they don't actively replicate their genomes, while regulating bacterial genes. If some phages have evolved to insert only in highly conserved sites [70], others as transposable phages integrate themselves randomly in the host genome, possibly inactivating genes coding for essential functions and having therefore a detrimental effect on host fitness [71]. Some phages are also able to display "active lysogeny", acting as regulatory switches, as they turn off a gene by integrating in its sequence [72].

Phages can stay in lysogenic cycle for several generations. However, they are not totally inactive since the bacterial cell expresses during lysogeny moron genes (for "more DNA") that are not necessary for the phage cycle [73,74]. A well-known example is the *stx* gene coding for shigatoxin, which is acquired by bacterial strains through lysogenic conversion, meaning the acquisition of a *stx*-positive prophage [75]. These morons are far from being all characterized, but they probably enhance bacterial fitness and expand the environmental niche of the host [76].

Conclusions

Fermented foods represent undoubtedly suitable ecosystems for the development of bacteriophages. The isolation of a large set of bacteriophages and the first viral metagenomics data shed light into the viral diversity of this type of products. However, the question of the impact of this diversity on the composition and functioning of microbial communities still remains underexplored.

The continuous improvement of sequencing techniques, with in particular the first applications of long-read sequencing for the description of metaviromes [77]**, makes it possible to envisage both the description and the monitoring of the composition of viral communities in fermented foods more easily and in a more comprehensive way.

Furthermore, synthetic microbial ecosystems offer new perspectives for investigating individual to ecosystem level microbial interactions [78]. The viral dimension of food microbial ecosystems should therefore be considered for the future design of synthetic ecology experiments with the objective of characterizing the role of bacteriophages in fermented foods.

The exploitation of this knowledge should help the food industry facing numerous challenges such as controlling phage contamination to reduce the risk of fermentation failure. Main applications are the biocontrol of pathogens [79] and spoilage bacteria [26]* but new developments could lead to finely modulate the composition of microbial communities in order to reach the desired technological properties in fermented products.

Acknowledgements

T.P. is the recipient of a doctoral fellowship from the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation (MESRI) and the MICA department of the French National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE). E.D-B is member of the knowledge hub SYSTEMIC which received funding from several national research funding parties in a joint action of JPI HDHL, JPI-OCEANS and FACCE-JPI launched under the ERA-NET ERA-HDHL (n° 696295). The authors thank Marie-Agnès Petit (INRAE) for her critical review of the manuscript.

Declaration of interest. None.

References

1. Tamang JP, Cotter PD, Endo A, Han NS, Kort R, Liu SQ, Mayo B, Westerik N, Hutkins R: **Fermented foods in a global age: East meets West**. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2020, **19**:184–217.
2. Marco ML, Heeney D, Binda S, Cifelli CJ, Cotter PD, Foligne B, Ganzle M, Kort R, Pasin G, Pihlanto A, et al.: **Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond**. *Curr Opin Biotechnol* 2017, **44**:94–102.
3. Hugenholtz J: **Traditional biotechnology for new foods and beverages**. *Current Opinion in Biotechnology* 2013, **24**:155–159.
4. Smid EJ, Lacroix C: **Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentations**. *Curr Opin Biotechnol* 2013, **24**:148–154.
5. Walsh AM, Crispie F, Claesson MJ, Cotter PD: **Translating Omics to Food Microbiology**. *Annual Review of Food Science and Technology* 2017, **8**:113–134.
6. Irlinger F, Layec S, Hélinck S, Dugat-Bony E: **Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin**. *FEMS Microbiol Lett* 2015, **362**:1–11.
7. Fierer N, Breitbart M, Nulton J, Salamon P, Lozupone C, Jones R, Robeson M, Edwards RA, Felts B, Rayhawk S, et al.: **Metagenomic and Small-Subunit rRNA Analyses Reveal the Genetic Diversity of Bacteria, Archaea, Fungi, and Viruses in Soil**. *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**:7059–7066.
8. Breitbart M, Salamon P, Andresen B, Mahaffy JM, Segall AM, Mead D, Azam F, Rohwer F: **Genomic analysis of uncultured marine viral communities**. *PNAS* 2002, **99**:14250–14255.
9. Tamang JP, Watanabe K, Holzapfel WH: **Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages**. *Front Microbiol* 2016, **7**.
10. Koskella B, Brockhurst MA: **Bacteria–phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities**. *FEMS Microbiol Rev* 2014, **38**:916–931.
11. Sausset R, Petit MA, Gaboriau-Routhiau V, De Paepe M: **New insights into intestinal phages**. *Mucosal Immunology* 2020, **13**:205–215.
12. Whitehead HR, Cox GA: *The Occurrence of Bacteriophage in Cultures of Lactic Streptococci: A Preliminary Note*. Government Printer; 1935.
13. Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP: **Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay**. In *Bacteriophages*. Edited by Clokie MRJ, Kropinski AM. Humana Press; 2009:69–76.
14. Cordero-Bueso G, Moraga J, Ríos-Carrasco M, Ruiz-Muñoz M, Cantoral JM: **Bacteriophages as an Up-and-Coming Alternative to the Use of Sulfur Dioxide in Winemaking**. *Front Microbiol* 2020, **10**:2931.

15. Cheng L, Marinelli LJ, Grosset N, Fitz-Gibbon ST, Bowman CA, Dang BQ, Russell DA, Jacobs-Sera D, Shi B, Pellegrini M, et al.: **Complete genomic sequences of Propionibacterium freudenreichii phages from Swiss cheese reveal greater diversity than Cutibacterium (formerly Propionibacterium) acnes phages.** *BMC Microbiology* 2018, **18**:19.
16. International Committee on Taxonomy of Viruses, King AMQ (Eds): *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press; 2012.
17. Philippe C, Krupovic M, Jaomanjaka F, Claisse O, Petrel M, Le Marrec C: **Bacteriophage GC1, a Novel Tectivirus Infecting Gluconobacter Cerinus, an Acetic Acid Bacterium Associated with Wine-Making.** *Viruses* 2018, **10**:39.
18. De Melo AG de, Rousseau GM, Tremblay DM, Labrie SJ, Moineau S: **DNA tandem repeats contribute to the genetic diversity of Brevibacterium aurantiacum phages.** *Environmental Microbiology* 2020, **22**:3413–3428.
19. Levine M: **Mutations in the temperate phage P22 and lysogeny in Salmonella.** *Virology* 1957, **3**:22–41.
20. Kleppen HP, Holo H, Jeon S-R, Nes IF, Yoon S-S: **Novel Podoviridae Family Bacteriophage Infecting Weissella cibaria Isolated from Kimchi.** *Appl Environ Microbiol* 2012, **78**:7299–7308.
21. Gautier M, Rouault A, Hervé C, Sommer P, Leret V, Jan G, Fraslin J-M, Prévot F, Coste A: **Bacteriophages of dairy propionibacteria.** *Lait* 1999, **79**:93–104.
22. Lu Z, Altermann E, Breidt F, Kozyavkin S: **Sequence Analysis of Leuconostoc mesenteroides Bacteriophage Φ1-A4 Isolated from an Industrial Vegetable Fermentation.** *Appl Environ Microbiol* 2010, **76**:1955–1966.
23. Costantini A, Doria F, Saiz J-C, Garcia-Moruno E: **Phage-host interactions analysis of newly characterized Oenococcus oeni bacteriophages: Implications for malolactic fermentation in wine.** *International Journal of Food Microbiology* 2017, **246**:12–19.
24. Garneau JE, Moineau S: **Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations.** *Microb Cell Fact* 2011, **10**:S20.
25. Brüssow H: **Phages of Dairy Bacteria.** *Annual Review of Microbiology* 2001, **55**:283–303.
26. Del Rio B, Sánchez-Llana E, Redruello B, Magadan AH, Fernández M, Martín MC, Ladero V, Alvarez MA: **Enterococcus faecalis Bacteriophage 156 Is an Effective Biotechnological Tool for Reducing the Presence of Tyramine and Putrescine in an Experimental Cheese Model.** *Front Microbiol* 2019, **10**:566.
27. Ladero V, Gómez-Sordo C, Sánchez-Llana E, Del Rio B, Redruello B, Fernández M, Martín MC, Alvarez MA: **Q69 (an E. faecalis-Infecting Bacteriophage) As a Biocontrol Agent for Reducing Tyramine in Dairy Products.** *Front Microbiol* 2016, **7**:445.

28. Kaletta J, Pickl C, Griebler C, Klingl A, Kurmayer R, Deng L: **A rigorous assessment and comparison of enumeration methods for environmental viruses.** *Scientific Reports* 2020, **10**:18625.
29. Melo LDR, França A, Brandão A, Sillankorva S, Cerca N, Azeredo J: **Assessment of Sep1virus interaction with stationary cultures by transcriptional and flow cytometry studies.** *FEMS Microbiol Ecol* 2018, **94**.
30. Montañez-Izquierdo VY, Salas-Vázquez DI, Rodríguez-Jerez JJ: **Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces.** *Food Control* 2012, **23**:470–477.
31. Carr B, Siupa A, Hole P, Malloy A, Hannell C: **Nanoparticle Tracking Analysis for the rapid and direct visualisation, sizing and counting of viruses, phage and VLPs in suspension.** *Hum Gene Ther* 2012, **23**:A8–A9.
32. Roose-Amsaleg C, Fedala Y, Vénien-Bryan C, Garnier J, Boccara A-C, Boccara M: **Utilization of interferometric light microscopy for the rapid analysis of virus abundance in a river.** *Res Microbiol* 2017, **168**:413–418.
33. Linderoth NA, Simon MN, Russel M: **The Filamentous Phage pIV Multimer Visualized by Scanning Transmission Electron Microscopy.** *Science* 1997, **278**:1635–1638.
34. Jebri S, Hmaied F, Yahya M, Ben Ammar A, Hamdi M: **Total coliphages removal by activated sludge process and their morphological diversity by transmission electron microscopy.** *Water Sci Technol* 2016, **74**:318–323.
35. Chaïb A, Decossas M, Philippe C, Claisse O, Lambert O, Le Marrec C: *Isolation and CryoTEM of Phages Infecting Bacterial Wine Spoilers.* 2020.
36. Dugat-Bony E, Lossouarn J, De Paepe M, Sarthou A-S, Fedala Y, Petit M-A, Chaillou S: **Viral metagenomic analysis of the cheese surface: A comparative study of rapid procedures for extracting viral particles.** *Food Microbiology* 2020, **85**:103278.
37. Park E-J, Kim K-H, Abell GCJ, Kim M-S, Roh SW, Bae J-W: **Metagenomic analysis of the viral communities in fermented foods.** *Appl Environ Microbiol* 2011, **77**:1284–1291.
38. Roux S, Enault F, Hurwitz BL, Sullivan MB: **VirSorter: mining viral signal from microbial genomic data.** *PeerJ* 2015, **3**:e985.
39. Zheng T, Li J, Ni Y, Kang K, Misiakou M-A, Imamovic L, Chow BKC, Rode AA, Bytzer P, Sommer M, et al.: **Mining, analyzing, and integrating viral signals from metagenomic data.** *Microbiome* 2019, **7**.
40. Jung JY, Lee SH, Kim JM, Park MS, Bae J-W, Hahn Y, Madsen EL, Jeon CO: **Metagenomic Analysis of Kimchi, a Traditional Korean Fermented Food.** *Appl Environ Microbiol* 2011, **77**:2264–2274.

41. Kumar J, Sharma N, Kaushal G, Samurailatpam S, Sahoo D, Rai AK, Singh SP: **Metagenomic Insights Into the Taxonomic and Functional Features of Kinema, a Traditional Fermented Soybean Product of Sikkim Himalaya.** *Front Microbiol* 2019, **10**.
42. Edwards RA, Rohwer F: **Viral metagenomics.** *Nature Reviews Microbiology* 2005, **3**:504–510.
43. Kauffman KM, Hussain FA, Yang J, Arevalo P, Brown JM, Chang WK, VanInsberghe D, Elsherbini J, Sharma RS, Cutler MB, et al.: **A major lineage of non-tailed dsDNA viruses as unrecognized killers of marine bacteria.** *Nature* 2018, **554**:118–122.
44. Brum JR, Ignacio-Espinoza JC, Roux S, Doulcier G, Acinas SG, Alberti A, Chaffron S, Cruaud C, de Vargas C, Gasol JM, et al.: **Patterns and ecological drivers of ocean viral communities.** *Science* 2015, **348**:1261498–1261498.
45. Adriaenssens EM, Van Zyl L, De Maayer P, Rubagotti E, Rybicki E, Tuffin M, Cowan DA: **Metagenomic analysis of the viral community in Namib Desert hypoliths: Metaviromics of Namib hypoliths.** *Environ Microbiol* 2015, **17**:480–495.
46. Scola V, Ramond J-B, Frossard A, Zablocki O, Adriaenssens EM, Johnson RM, Seely M, Cowan DA: **Namib Desert Soil Microbial Community Diversity, Assembly, and Function Along a Natural Xeric Gradient.** *Microb Ecol* 2018, **75**:193–203.
47. Ledormand P, Desmasures N, Dalmaso M: **Phage community involvement in fermented beverages: an open door to technological advances?** *Crit Rev Food Sci Nutr* 2020, doi:10.1080/10408398.2020.1790497.
48. Jung M-J, Kim M-S, Yun J-H, Lee J-Y, Kim PS, Lee H-W, Ha J-H, Roh SW, Bae J-W: **Viral community predicts the geographical origin of fermented vegetable foods more precisely than bacterial community.** *Food Microbiology* 2018, **76**:319–327.
49. Dugat-Bony E, GARNIER L, Denonfoux J, Ferreira S, Sarthou A-S, Bonnarme P, Irlinger F: **Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties.** *International Journal of Food Microbiology* 2016, **238**:265–273.
50. Kong S-J, Park J-H: **Effect of Bacteriophages on Viability and Growth of Co-cultivated Weissella and Leuconostoc in Kimchi Fermentation.** *J Microbiol Biotechnol* 2019, **29**:558–561.
51. Erkus O, de Jager VC, Spus M, van Alen-Boerrigter IJ, van Rijswijck IM, Hazelwood L, Janssen PW, van Hijum SA, Kleerebezem M, Smid EJ: **Multifactorial diversity sustains microbial community stability.** *The ISME Journal* 2013, **7**:2126–2136.
52. Chopin A, Bolotin A, Sorokin A, Ehrlich SD, Chopin M-C: **Analysis of six prophages in Lactococcus lactis IL1403: different genetic structure of temperate and virulent phage populations.** *Nucleic Acids Research* 2001, **29**:644–651.

53. Thingstad TF: **Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems.** *Limnology and Oceanography* 2000, **45**:1320–1328.
54. Breitbart M, Rohwer F: **Here a virus, there a virus, everywhere the same virus?** *Trends in Microbiology* 2005, **13**:278–284.
55. Brum JR, Ignacio-Espinoza JC, Roux S, Doucier G, Acinas SG, Alberti A, Chaffron S, Cruaud C, Vargas C de, Gasol JM, et al.: **Patterns and ecological drivers of ocean viral communities.** *Science* 2015, **348**.
56. Shapiro OH, Kushmaro A, Brenner A: **Bacteriophage predation regulates microbial abundance and diversity in a full-scale bioreactor treating industrial wastewater.** *The ISME Journal* 2010, **4**:327–336.
57. Rodriguez-Valera F, Martin-Cuadrado A-B, Rodriguez-Brito B, Pasić L, Thingstad TF, Rohwer F, Mira A: **Explaining microbial population genomics through phage predation.** *Nat Rev Microbiol* 2009, **7**:828–836.
58. Aucouturier A, Chain F, Langella P, Bidnenko E: **Characterization of a Prophage-Free Derivative Strain of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403 Reveals the Importance of Prophages for Phenotypic Plasticity of the Host.** *Front Microbiol* 2018, **9**:2032.
59. Fernández L, Rodríguez A, García P: **Phage or foe: an insight into the impact of viral predation on microbial communities.** *The ISME Journal* 2018, **12**:1171–1179.
60. Burmeister AR, Abedon ST, Turner PE: **Bacteriophage Ecology.** In *Reference Module in Life Sciences*. . Elsevier; 2019:B9780128096338907000.
61. Fazzino L, Anisman J, Chacón JM, Heineman RH, Harcombe WR: **Lytic bacteriophage have diverse indirect effects in a synthetic cross-feeding community.** *The ISME Journal* 2020, **14**:123–134.
62. Hampton HG, Watson BNJ, Fineran PC: **The arms race between bacteria and their phage foes.** *Nature* 2020, **577**:327–336.
63. Lythgoe KA, Read AF: **Catching the Red Queen? The advice of the Rose.** *Trends in Ecology & Evolution* 1998, **13**:473–474.
64. Stern A, Sorek R: **The phage-host arms-race: Shaping the evolution of microbes.** *Bioessays* 2011, **33**:43–51.
65. Paterson S, Vogwill T, Buckling A, Benmayor R, Spiers AJ, Thomson NR, Quail M, Smith F, Walker D, Libberton B, et al.: **Antagonistic coevolution accelerates molecular evolution.** *Nature* 2010, **464**:275–278.
66. Touchon M, Moura de Sousa JA, Rocha EP: **Embracing the enemy: the diversification of microbial gene repertoires by phage-mediated horizontal gene transfer.** *Curr Opin Microbiol* 2017, **38**:66–73.

67. Keen EC, Bliskovsky VV, Malagon F, Baker JD, Prince JS, Klaus JS, Adhya SL: **Novel “Superspreader” Bacteriophages Promote Horizontal Gene Transfer by Transformation.** *mBio* 2017, **8**.
68. Braga LPP, Soucy SM, Amgarten DE, da Silva AM, Setubal JC: **Bacterial Diversification in the Light of the Interactions with Phages: The Genetic Symbionts and Their Role in Ecological Speciation.** *Front Ecol Evol* 2018, **6**.
69. Fuhrman JA: **Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects.** *Nature* 1999, **399**:541–548.
70. Bobay L-M, Rocha EPC, Touchon M: **The Adaptation of Temperate Bacteriophages to Their Host Genomes.** *Molecular Biology and Evolution* 2013, **30**:737–751.
71. Toussaint A, Rice PA: **Transposable phages, DNA reorganization and transfer.** *Current Opinion in Microbiology* 2017, **38**:88–94.
72. Feiner R, Argov T, Rabinovich L, Sigal N, Borovok I, Herskovits AA: **A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria.** *Nat Rev Microbiol* 2015, **13**:641–650.
73. Brüssow H, Canchaya C, Hardt W-D: **Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2004, **68**:560–602.
74. Tsao Y-F, Taylor VL, Kala S, Bondy-Denomy J, Khan AN, Bona D, Cattoir V, Lory S, Davidson AR, Maxwell KL: **Phage Morons Play an Important Role in Pseudomonas aeruginosa Phenotypes.** *Journal of Bacteriology* 2018, **200**.
75. Davis BM, Kimsey HH, Kane AV, Waldor MK: **A satellite phage-encoded antirepressor induces repressor aggregation and cholera toxin gene transfer.** *EMBO J* 2002, **21**:4240–4249.
76. Taylor VL, Fitzpatrick AD, Islam Z, Maxwell KL: **Chapter One - The Diverse Impacts of Phage Morons on Bacterial Fitness and Virulence.** In *Advances in Virus Research*. Edited by Kielian M, Mettenleiter TC, Roossinck MJ. Academic Press; 2019:1–31.
77. Beaulaurier J, Luo E, Eppley JM, Uyl PD, Dai X, Burger A, Turner DJ, Pendleton M, Juul S, Harrington E, et al.: **Assembly-free single-molecule sequencing recovers complete virus genomes from natural microbial communities.** *Genome Res* 2020, doi:10.1101/gr.251686.119.
78. Shetty SA, Smidt H, de Vos WM: **Reconstructing functional networks in the human intestinal tract using synthetic microbiomes.** *Current Opinion in Biotechnology* 2019, **58**:146–154.
79. El Haddad L, Roy J-P, Khalil GE, St-Gelais D, Champagne CP, Labrie S, Moineau S: **Efficacy of two Staphylococcus aureus phage cocktails in cheese production.** *Int J Food Microbiol* 2016, **217**:7–13.

80. Lu Z, Breidt F, Fleming HP, Altermann E, Klaenhammer TR: **Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, Φ JL-1, from a cucumber fermentation.** *International Journal of Food Microbiology* 2003, **84**:225–235.
81. Lu Z, Pérez-Díaz IM, Hayes JS, Breidt F: **Bacteriophage Ecology in a Commercial Cucumber Fermentation.** *Appl Environ Microbiol* 2012, **78**:8571–8578.
82. Yoon S-S, Barrangou-Pouey R, Breidt F, Fleming HP: **Detection and characterization of a lytic *Pediococcus* bacteriophage from the fermenting cucumber brine.** *J Microbiol Biotechnol* 2007, **17**:262–270.
83. Nagai T, Yamasaki F: ***Bacillus subtilis* (natto) Bacteriophages Isolated in Japan.** *FSTR* 2009, **15**:293–298.
84. Oh H, Seo DJ, Jeon SB, Park H, Jeong S, Chun HS, Oh M, Choi C: **Isolation and Characterization of *Bacillus cereus* Bacteriophages from Foods and Soil.** *Food Environ Virol* 2017, **9**:260–269.
85. Shin H, Bandara N, Shin E, Ryu S, Kim K: **Prevalence of *Bacillus cereus* bacteriophages in fermented foods and characterization of phage JBP901.** *Research in Microbiology* 2011, **162**:791–797.
86. Uchida K, Kanbe C: **OCCURRENCE OF BACTERIOPHAGES LYTIC FOR *PEDIOCOCCUS HALOPHILUS*, A HALOPHILIC LACTIC-ACID BACTERIUM, IN SOY SAUCE FERMENTATION.** *The Journal of General and Applied Microbiology* 1993, **39**:429–437.
87. Antoni GD, Zago M, Vasek O, Giraffa G, Carminati D, Marcó MB, Reinheimer J, Suárez V: ***Lactobacillus plantarum* bacteriophages isolated from Kefir grains: phenotypic and molecular characterization.** *Journal of Dairy Research* 2010, **77**:7–12.
88. Yoon S-S, Kim J-W, Breidt F, Fleming HP: **Characterization of a lytic *Lactobacillus plantarum* bacteriophage and molecular cloning of a lysin gene in *Escherichia coli*.** *International Journal of Food Microbiology* 2001, **65**:63–74.
89. Bruttin A, Marchesini B, Moreton RS, Sozzi T: ***Staphylococcus carnosus* bacteriophages isolated from salami factories in Germany and Italy.** *Journal of Applied Bacteriology* 1992, **73**:401–406.
90. Barrangou R, Yoon S-S, Frederick Breidt J, Fleming HP, Klaenhammer TR: **Characterization of Six *Leuconostoc fallax* Bacteriophages Isolated from an Industrial Sauerkraut Fermentation.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**:5452–5458.
91. Lu Z, Breidt F, Plengvidhya V, Fleming HP: **Bacteriophage Ecology in Commercial Sauerkraut Fermentations.** *Applied and Environmental Microbiology* 2003, **69**:3192–3202.
92. Mudgal P, Breidt F, Lubkin SR, Sandeep KP: **Quantifying the Significance of Phage Attack on Starter Cultures: a Mechanistic Model for Population Dynamics of Phage and Their Hosts Isolated from Fermenting Sauerkraut.** *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**:3908–3915.

93. Yoon SS, Barrangou-Pouey R, Breidt F, Klaenhammer TR, Fleming HP: **Isolation and Characterization of Bacteriophages from Fermenting Sauerkraut.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**:973–976.
94. Foschino R, Picozzi C, Galli A: **Comparative study of nine Lactobacillus fermentum bacteriophages.** *Journal of Applied Microbiology* 2001, **91**:394–403.
95. Foschino R, Venturelli E, Picozzi C: **Isolation and characterization of a virulent Lactobacillus sanfranciscensis bacteriophage and its impact on microbial population in sourdough.** *Curr Microbiol* 2005, **51**:413–418.
96. Arendt EK, Hammes WP: **Isolation and characterization of Leuconostoc oenos phages from German wines.** *Appl Microbiol Biotechnol* 1992, **37**:643–646.
97. Davis C, Silveira NF, Fleet GH: **Occurrence and properties of bacteriophages of Leuconostoc oenos in Australian wines.** *Applied and Environmental Microbiology* 1985, **50**:872–876.
98. Henick-Kling T, Lee TH, Nicholas DJD: **Characterization of the lytic activity of bacteriophages of Leuconostoc oenos isolated from wine.** *Journal of Applied Bacteriology* 1986, **61**:525–534.
99. Jaomanjaka F, Claisse O, Blanche-Barbat M, Petrel M, Ballestra P, Marrec CL: **Characterization of a new virulent phage infecting the lactic acid bacterium Oenococcus oeni.** *Food Microbiology* 2016, **54**:167–177.
100. Nel L, Wingfield BD, Van der Meer LJ, Van Vuuren HJJ: **Isolation and characterization of Leuconostoc oenos bacteriophages from wine and sugarcane.** *FEMS Microbiol Lett* 1987, **44**:63–67.
101. Santos R, Vieira G, Santos MA, Paveia H: **Characterization of temperate bacteriophages of Leuconostoc oenos and evidence for two prophage attachment sites in the genome of starter strain PSU-1.** *Journal of Applied Bacteriology* 1996, **81**:383–392.

Discussion

De nombreuses publications, portant sur divers exemples d'aliments fermentés ont été recensées. Parmi les écosystèmes étudiés se trouvent des aliments d'origine végétale (vin, choucroute et soja par exemple) et animale (saucissons et fromage). Très souvent, seuls un à plusieurs phages ont été isolés et caractérisés, à partir d'échantillons provenant d'une fermentation défectueuse. L'objectif principal de ces travaux est d'identifier la cause de la perturbation du processus de fermentation qui a engendré une perte de la production. Pour cela, les auteurs cherchent à démontrer que le/les phages isolés infectent la/les bactéries essentielles au bon déroulement de la fermentation. Les bactéries en question sont pour la grande majorité des LAB appartenant par exemple aux genres *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*, ou à la famille des *Lactobacillaceae*. Les phages qui les infectent sont quasiment tous caudés, et appartiennent donc à la classe des *Caudoviricetes*. Ils sont principalement virulents ou tempérés, très peu de phages filamenteux chroniques ayant été détectés à ce jour dans les aliments fermentés.

En s'intéressant à d'autres types d'écosystèmes, il est évident que les phages impactent directement la cinétique de croissance de leur hôtes bactériens, et indirectement les autres microorganismes présents dans l'écosystème. Par exemple, lorsqu'une bactérie se développe mieux que ses concurrentes dans un milieu, sa fitness élevée est compensée par la prédation phagique, selon le modèle du « Kill-the-Winner » (impact direct). Cette pression de sélection permet d'expliquer pourquoi plusieurs bactéries (espèces différentes ou souches différentes d'une même espèce) partageant la même niche écologique peuvent coexister. Par ailleurs, la lyse bactérienne liée à la multiplication des phages a pour effet de recycler la matière organique piégée dans le cytoplasme des bactéries hôtes, en la rendant disponible pour d'autres organismes hétérotrophes présents dans le milieu (effet indirect). Le parasitisme est également un facteur qui oriente l'évolution des hôtes bactériens, puisque dans une population attaquée par un bactériophage seuls les individus présentant un phénotype résistant transmettent leur information génétique à la descendance. Les phages tempérés peuvent modifier le génome de leur hôte au cours de l'infection, par transduction, ce qui peut également avoir un impact sur la fitness de ce dernier. En effet, l'expression de gènes additionnels codés par le prophage, appelés « morons », confère parfois un avantage à la bactérie hôte par rapport aux bactéries non-lysogènes.

Pour résumer, ce chapitre met en lumière le manque de travaux de recherche sur le rôle écologique des phages dans les aliments fermentés, dont le fromage, et ouvre de nombreuses questions sur l'impact de ces entités biologiques dans ce type d'écosystèmes. Pour aborder ces questions, plusieurs approches sont envisageables, comme par exemple :

- étudier l'effet d'un phage isolé sur la dynamique d'une communauté microbienne *in vitro* en utilisant une approche d'écologie synthétique (Reyes et al. 2013). Pour cela une communauté microbienne réduite, représentative de l'écosystème étudié, est reconstituée *in vitro* puis inoculée dans un milieu synthétique dont le maximum de paramètres sont contrôlés afin d'isoler l'effet potentiel du phage étudié. Cette approche d'écologie synthétique nécessite d'avoir à disposition des représentants des espèces microbiennes clés de l'écosystème étudié, et au moins un phage bien caractérisé capable d'infecter une des bactéries utilisées.
- étudier sans a priori la dynamique de l'ensemble des populations microbiennes et virales de l'aliment fermenté réel au cours du procédé de fermentation (Queiroz et al. 2022). En effet si des changements de composition de la communauté bactérienne, en particulier, s'accompagnent de changements dans les populations de phages, cela peut refléter en partie l'activité de prédation phagique. Cette approche ne nécessite pas l'isolement préalable de phages représentatifs de l'écosystème étudié mais ne permet pas non plus d'obtenir une preuve directe de l'existence d'une interaction entre un phage donné et une bactérie hôte potentielle.
- étudier la persistance des phages au sein de produits fermentés provenant de la même unité de production (fabrications indépendantes, éloignées dans le temps). En effet, si la présence de certaines espèces (de bactéries, champignons ou même de phages) est observée de manière répétée et stable dans le temps, cela suggère qu'elles occupent une place importante dans l'écosystème étudié (Raymond-Fleury et al. 2022). Dans le cas contraire, elles seraient soumises à l'extinction et uniquement détectées de manière aléatoire dans les échantillons étudiés.

Dans les deux chapitres suivants sont décrits des travaux de recherche expérimentaux menés sur un fromage de type PMCL, qui mettent en œuvre ou initient la mise en œuvre future de ces différentes approches.

CHAPITRE 2

Isolement et caractérisation de bactériophages de la surface d'un fromage à pâte molle et croûte lavée et recherche de leurs réservoirs

Avant-propos

Dans l'optique d'étudier le rôle écologique des phages dans l'écosystème microbien fromager, il était important de pouvoir avoir accès à certains de leurs représentants. C'est pourquoi, l'objectif des travaux présentés dans ce chapitre a été d'isoler des phages à partir de la croûte d'un fromage PMCL français et de les caractériser.

Des travaux préliminaires ayant pour but d'optimiser un protocole d'extraction de particules virales à partir de la surface du fromage pour mener des études de métagnomique virale suggéraient qu'une communauté diverse de phages était présente dans cet écosystème (Dugat-Bony et al. 2020). En effet, un fromage de type PMCL avait été sélectionné, parmi d'autres variétés, pour produire le premier métavirome de la surface du fromage. Plusieurs contigs provenant de génomes de phages avaient alors été détectés, et des hôtes potentiels leur avaient été associés par comparaison de séquences avec les génomes de phages déjà connus. Sur la base de ces prédictions, des bactéries appartenant aux genres *Glutamicibacter*, *Lactococcus*, *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*, *Leuconostoc* et *Halomonas* étaient alors suspectées d'être soumises à de la prédation phagique. Néanmoins, ce résultat obtenu à partir de signaux génomiques (*in silico*) restait à confirmer *in vitro*.

Démarche

Une collection d'environ 200 isolats bactériens a été réalisée à partir d'échantillons de surface d'un fromage de type PMCL. De part la nature de l'échantillon (surface de fromage) et les milieux utilisés pour l'isolement (BHI Agar, Marine Agar supplémenté ou non en NaCl et MRS Agar), l'objectif était d'obtenir majoritairement des isolats de bactéries se développant pendant la phase d'affinage du fromage (autres que les ferments lactiques) pour ensuite les utiliser pour isoler des phages représentatifs de la communauté virale de la surface de ce fromage. En effet, la littérature rapportant l'isolement des phages de ferments lactiques à partir de nombreux produits laitiers est déjà particulièrement abondante.

En parallèle, la fraction virale du même fromage a été purifiée selon le protocole mis au point précédemment (Dugat-Bony et al. 2020). Il comporte des étapes de filtration, de précipitation au polyéthylène glycol (PEG) et de traitement au chloroforme. Cette fraction virale a été mise en contact, après enrichissement, avec les isolats bactériens par la technique du « spot assay » en gélose double couche, afin d'isoler des phages. Les phages isolés ont ensuite été purifiés

par des étalements successifs puis des stocks concentrés ont été produits. Les phages purs ont finalement été caractérisés à plusieurs niveaux : spectres d'hôtes (contre des isolats de différentes espèces provenant de différents fromages), séquençage et annotation du génome complet, analyse morphologique et test de sensibilité à la température.

Afin d'identifier les réservoirs potentiels de ces phages au sein de la fromagerie, des échantillons ont été prélevés dans l'usine produisant le fromage étudié. Ces échantillons proviennent des surfaces de certains équipements, du lait après ensemencement et des solutions de lavage utilisées pour les soins de croûte durant l'affinage. Ils ont été mis en contact avec les souches indicatrices sensibles aux phages isolés à partir du fromage, par la technique du « spot assay » en gélose double couche avec ou sans enrichissement préalable. Lorsque des zones de lyses étaient observées, une confirmation de la présence du phage recherché a été effectuée par PCR avec des amorces spécifiques.

Les résultats de cette étude ont été publiés en 2022 sous forme d'article de recherche dans le numéro spécial « Roles and Applications of Phages in the Food Industry and Agriculture » du journal « Viruses » (<https://doi.org/10.3390/v14081620>).

Principaux résultats

La campagne d'isolement bactérien a permis d'isoler plus de 200 bactéries de la croûte, qui ont par la suite été identifiées par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. Les espèces les plus fréquemment isolées correspondent à des bactéries typiques de la surface des fromages PMCL en fin d'affinage : *Glutamicibacter arilaitensis*, *Psychrobacter aquimaris* et *P. cibarius*, *Leuconostoc falkenbergense* et *L. mesenteroides*, *Halomonas nigrificans*.

Cette collection d'isolats a été criblée par spot assay pour repérer les isolats sensibles à des phages présents dans la fraction virale obtenue à partir de la surface du même fromage et, par la même occasion, isoler des phages représentatifs de la communauté virale de cet écosystème. Cette étape s'est soldée par l'isolement de cinq phages virulents infectant les espèces *Brevibacterium aurantiacum* (un phage baptisé Rousseau), *Glutamicibacter arilaitensis* (deux phages : Voltaire et Montesquieu), *Leuconostoc falkenbergense* (un phage : Diderot) et *Psychrobacter aquimaris* (un phage : D'Alembert). Chaque phage a été caractérisé d'un point de vue génomique et phénotypique.

La comparaison des génomes des cinq phages avec ceux présents dans les bases de données internationales et leur annotation ont permis de conclure que quatre d'entre eux sont nouveaux, c'est-à-dire qu'ils présentent au mieux une faible homologie de séquence et sur des portions limitées du génome avec des séquences génomiques de phage connus. Seul Diderot est très proche d'un phage déjà identifié, *Leuconostoc* phage LN03 (>98% d'identité nucléotidique sur >98% de la longueur du génome).

L'analyse par microscopie électronique à transmission a permis d'obtenir la morphologie et les dimensions des cinq phages étudiés. Tous sont caudés et appartiennent à la classe des *Caudoviricetes*. Parmi eux, trois sont des siphophages (Diderot, Montesquieu et Rousseau), D'Alembert est un myophage et Voltaire est un podophage. Les morphotypes observés concordent avec les prédictions réalisées à partir des séquences génomiques (présence/absence de certains gènes caractéristiques).

Les spectres d'hôtes des cinq phages isolés sont très étroits. En effet, ces phages ne sont capables d'infecter que des isolats d'une seule espèce et tous isolés du fromage PMCL étudié. Nous avons également observé qu'ils restaient infectieux dans les gammes de températures utilisées pour l'affinage de ce type de fromages (gamme testée : 12-30 °C).

En complément de la caractérisation des phages, l'analyse d'échantillons provenant de l'usine produisant le fromage étudié, a permis d'identifier des réservoirs potentiels abritant un ou plusieurs des cinq phages nouvellement isolés. Ainsi, des phages infectant les mêmes souches indicatrices que Rousseau, Diderot, Montesquieu et d'Alembert ont été détectés à partir d'une ligne de retournement de fromage. Un phage proche de Diderot a également été détecté sur une plaque de salage. Ces phages étaient tous suffisamment abondants au sein des échantillons analysés pour être détectables sans enrichissement préalable, ce qui témoigne a priori d'un niveau élevé de contamination.

Article

Virulent Phages Isolated from a Smear-Ripened Cheese Are Also Detected in Reservoirs of the Cheese Factory

Thomas Paillet¹, Julien Lossouarn², Clarisse Figueroa¹, Cédric Midoux^{3,4,5}, Olivier Rué^{3,4}, Marie-Agnès Petit² and Eric Dugat-Bony^{1,*}

¹ Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR SayFood, 91120 Palaiseau, France; thomas.paillet@inrae.fr (T.P.); clarisse.figueroa4@gmail.com (C.F.)

² Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78352 Jouy-en-Josas, France; julien.lossouarn@inrae.fr (J.L.); marie-agnes.petit@inrae.fr (M.-A.P.)

³ Université Paris-Saclay, INRAE, MaIAGE, 78350 Jouy-en-Josas, France; cedric.midoux@inrae.fr (C.M.); olivier.rue@inrae.fr (O.R.)

⁴ Université Paris-Saclay, INRAE, BioinfOmics, MIGALE Bioinformatics Facility, 78350 Jouy-en-Josas, France

⁵ Université Paris-Saclay, INRAE, PROSE, 92761 Antony, France

* Correspondence: eric.dugat-bony@inrae.fr

Abstract: Smear-ripened cheeses host complex microbial communities that play a crucial role in the ripening process. Although bacteriophages have been frequently isolated from dairy products, their diversity and ecological role in such this type of cheese remain underexplored. In order to fill this gap, the main objective of this study was to isolate and characterize bacteriophages from the rind of a smear-ripened cheese. Thus, viral particles extracted from the cheese rind were tested through a spot assay against a collection of bacteria isolated from the same cheese and identified by sequencing the full-length small subunit ribosomal RNA gene. In total, five virulent bacteriophages infecting *Brevibacterium aurantiacum*, *Glutamicibacter arilaitensis*, *Leuconostoc falkenbergense* and *Psychrobacter aquimaris* species were obtained. All exhibit a narrow host range, being only able to infect a few cheese-rind isolates within the same species. The complete genome of each phage was sequenced using both Nanopore and Illumina technologies, assembled and annotated. A sequence comparison with known phages revealed that four of them may represent at least new genera. The distribution of the five virulent phages into the dairy-plant environment was also investigated by PCR, and three potential reservoirs were identified. This work provides new knowledge on the cheese rind viral community and an overview of the distribution of phages within a cheese factory.

Keywords: smear-ripened cheese; virulent phages; rind bacteria; phage reservoirs; viral genomics



Citation: Paillet, T.; Lossouarn, J.; Figueroa, C.; Midoux, C.; Rué, O.; Petit, M.-A.; Dugat-Bony, E. Virulent Phages Isolated from a Smear-Ripened Cheese Are Also Detected in Reservoirs of the Cheese Factory. *Viruses* **2022**, *14*, 1620. <https://doi.org/10.3390/v14081620>

Academic Editors: Cécile Philippe, Jennifer Mahony and Adeline Goulet

Received: 3 June 2022

Accepted: 22 July 2022

Published: 25 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cheese is a fermented food hosting a complex microbial ecosystem, comprising bacteria (mainly *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Proteobacteria*), yeasts and molds in varying proportions [1]. These microorganisms can naturally originate from raw milk or colonize the facility environment. They are thus commonly referred to as the “house” microbiota, which is specific to each dairy plant [2]. They can also be intentionally added during the cheese production process via the use of commercial starters, ripening cultures or through back slopping procedures [3,4]. The controlled succession of these microorganisms all along the production process is key in obtaining a final product meeting the expectations of the consumer in terms of visual appearance, organoleptic qualities and safety.

In dairy plants, equipment is carefully washed to avoid the formation of biofilms and, moving forward, logic is widely applied to avoid cross-contaminations. At the industrial scale, raw milk is often pasteurized at the beginning of the process [5] to eliminate undesirable microorganisms before starter cultures' inoculation. Acidifying starter cultures, composed of lactic acid bacteria (LAB), such as *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*

or *Lactobacillus* species, provides a fast acidification of the milk that helps the coagulation process and reduces the growth of acid-sensitive bacteria [6], in particular pathogens and spoilage microorganisms. They also participate in the overall degradation of milk constituents and production of aroma compounds, e.g., through their proteolytic activities and amino acids' catabolism [7]. The combination of all the technological factors and microbial inhibition activities presented above, known as the hurdle technology [8], ensures achieving a safe product with acceptable shelf life [3]. However, a recurrent agent is still often beyond the control of these measures: the bacteriophages. Bacteriophages, or phages, are viruses infecting bacteria to replicate and represent a key player in the dynamics of many microbial ecosystems [9–11]. In fermented foods, and dairy products in particular, phages are frequently isolated after a fermentation failure [12]. As many phages are able to infect acidifying starter cultures (e.g., *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*) [13], their detrimental impact on milk acidification is very well-described in the literature [14–16]. Phage issues concern every size of plants, every kind of dairy product [17–20], and may result in important economic losses.

Among dairy products, smear-ripened cheeses are of special interest because of their singular production process, involving several washing steps with a saline solution sometimes mixed with alcoholic beverages (wine, beer or liquors). Smear-ripened cheeses possess a typical viscous, red-orange smear on their surface which is mainly composed of bacteria and yeasts [21,22]. The bacteria observed in the rind of such a type of cheese are diverse and comprise coryneform bacteria, staphylococci and various Gram-negative bacteria [23–25]. Regarding viral diversity, a metaviromic study conducted on the surface of a smear-ripened cheese revealed the presence of a wide diversity of phage sequence fragments [26]. Host predictions suggested that these phages may target several typical bacteria of smear-ripened cheeses' community. Recently, the isolation of phages infecting *Brevibacterium aurantiacum* from failed productions of a Canadian smear-ripened cheese was also reported [27]. Together, these results support the need for a deeper exploration of the viral community in smear-ripened cheese ecosystems.

In this study, we extracted viral particles from a French smear-ripened cheese and used it to infect a collection of bacteria isolated from the same cheese. Twelve phages-host combinations were obtained which ultimately allowed for isolating five virulent bacteriophages. Their characterization included morphological characteristics, genome sequencing, host range evaluation and infection capacity at different temperatures. Samples were also collected from the dairy plant producing the studied cheese and analyzed in order to identify their potential reservoirs.

2. Material and Methods

2.1. Sampling Procedure

Three soft smear-ripened cheeses of the same type, from the same dairy plant, and produced at the same date were purchased in a local food store in November 2019 and directly processed at the lab as triplicates. The rind was gently separated from the core using sterile knives (thickness ~2–3 mm), mixed using a sterile spatula and used further for microbial counts, bacterial isolation and extraction of viral particles.

2.2. Microbiological Analysis

2.2.1. Enumeration and Isolation of Microorganisms

Bacteria and yeasts were enumerated by plating suitable dilutions (10^{-4} to 10^{-7}) of one gram of cheese rind mixed in 9 mL of physiological water (9 g/L NaCl) on three different media as described in [26]. Brain Heart Infusion Agar (BHI, Biokar Diagnostics) supplemented with 50 mg/L amphotericin (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) was used to count total aerobic bacteria after 48 h of incubation at 28 °C. Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRS, Biokar Diagnostics, Allonne, France) supplemented with 50 mg/L amphotericin was used to count lactic acid bacteria after 48 h of incubation at 30 °C under

anaerobic conditions. Yeasts were counted on Yeast Extract Glucose Chloramphenicol (YEGC, Biokar Diagnostics, Allonne, France) after 48 h of incubation at 28 °C.

For bacterial isolation, appropriate dilutions (based on the enumeration) were plated on 14 cm diameter Petri dishes containing different growth media. Aerobic bacteria were isolated on rich non-selective BHI medium after incubation at 28 °C for 48 h. Lactic acid bacteria were isolated on MRS medium after incubation at 30 °C for 48 h under anaerobic conditions. Halophilic and halotolerant bacteria were isolated on Marine Agar medium (MA, Difco, BD, Franklin Lakes, NJ, USA). A condition with a final NaCl concentration at 40 g/L (instead of 20 g/L initially) was also tested. MA plates were incubated at three different temperatures (10, 15 and 28 °C) for 48 h to one week. All media were supplemented with 50 mg/L amphotericin to avoid the growth of yeasts and filamentous fungi. For each medium, an initial selection of apparently different morphotypes was performed based on colony morphology (shape and color after 48 h light exposure). A representative of each morphotype was then purified by restriking twice on a new plate. One colony was finally picked and grown in liquid medium (BHI broth, Marine broth or MRS broth) for 24 h before identification and finally stored at −80 °C in glycerol (20% final concentration).

2.2.2. Identification of Bacterial Isolates

For each isolate, genomic DNA extraction was performed as follows: 1–2 mL of an overnight culture in the appropriate broth medium (the same as that used for the isolation step) were centrifuged for 5 min at 5000× *g* and 4 °C. After removing the supernatant, the bacterial pellet was resuspended in 300 µL of TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), and 200 mg zirconium beads (BioSpec, Bartlesville, OK, USA), with a 50/50 ratio of 0.1 and 0.5 mm diameters, were added to the tube. Seventy-five µL of the lysozyme-lyticase mix (40 mg/mL and 100 U/mL, respectively, Sigma-Aldrich) were added, and the tube was incubated for 30 min at 37 °C. Forty µL of proteinase K (14 mg/mL, Amresco, VWR, Radnor, PA, USA) and 100 µL of sodium dodecyl sulfate (200 g/L, Sigma-Aldrich) were added, and the tube was incubated for 30 min at 55 °C. After cooling on ice, 500 µL of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1, pH 8, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) were added, and the tube was shaken in a Precellys Evolution homogenizer (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, France) for two 45 s mixing steps at a speed of 9500× *g*. The tube was cooled on ice for 5 min between mixing sequences. After centrifugation at 11,000× *g* for 15 min at room temperature, the aqueous phase was transferred to a Phase Lock Gel tube (Eppendorf, Montesson, France); 500 µL of phenol-chloroform-isoamyl alcohol were added, and the tube was gently mixed. After centrifugation at 11,000× *g* for 5 min at room temperature, the aqueous phase (approximately 700 µL) was transferred to a new Phase Lock Gel tube; 500 µL of chloroform (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) were added, and the tube was gently mixed. After centrifugation at 11,000× *g* for 5 min at room temperature, the aqueous phase was recovered in a 2 mL tube, mixed with 2 µL of RNase A (20 mg/mL; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) and incubated for 30 min at 37 °C. DNA was precipitated by adding 1200 µL (i.e., twice the aqueous phase volume) of absolute ethanol (Carlo Erba Reagents, Val-de-Reuil, France) and 60 µL (10% of the aqueous phase volume) of sodium acetate (3 M, pH 5.2, Sigma-Aldrich), followed by an incubation period of 30 min at −20 °C. The DNA was recovered by centrifugation at 11,000× *g* for 15 min at 4 °C. The DNA pellet was subsequently washed twice with 1 mL of either 80% or 70% ethanol (*v/v*) with a centrifugation step at 11,000× *g* for 5 min at 4 °C. The pellet was then dried for 30 min at 42 °C and dissolved in 100 to 200 µL of molecular biology grade water.

The small subunit ribosomal RNA gene was amplified using FS1A (5'-AGAGTTTGAT-CCTGGCTCAG-3') and FS5H (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') universal primers [28], and the Q5 Hot Start High Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA). Thermal cycling conditions were applied as follows: (i) 5 min at 95 °C for initial denaturation, (ii) 30 cycles of 30 s at 95 °C for denaturation, 30 s at 57 °C for primer annealing, 30 s at 72 °C for elongation, and (iii) 5 min at 72 °C to ensure final elongation.

DNA amplicons (expected size of 1500 bp) were assessed on 1.5% *w/v* agarose gel and sent for Sanger sequencing to Eurofins Genomics (Köln, Germany). Raw sequences were cleaned under Chromas version 2.6.6, and trimmed sequences were finally compared to the EzBioCloud database using the associated identification tool [29].

2.3. Isolation of Bacteriophages, Purification and Concentration

Extraction of the viral fraction from the cheese rind was performed according to protocol P4 detailed in [26] comprising a filtration step and a chloroform treatment. To enhance the chances to isolate phages, an enrichment step was performed as follows. Aerobic bacteria isolated from the cheese rind, including *Brevibacterium aurantiacum*, *Glutamicibacter arilaitensis*, *Psychrobacter aquimaris* and *Psychrobacter cibarius*, were grown overnight in pure cultures in 20 mL of BHI broth supplemented with 10 mM MgSO₄ and 1 mM CaCl₂, at 28 °C under agitation at 160 rpm. *Pseudoalteromonas nigrifaciens* was grown in similar conditions, Marine broth (MB) replacing the BHI broth. *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc falkenbergense* were grown in hermetic tubes with 9 mL of MRS broth supplemented with 10 mM MgSO₄ and 1 mM CaCl₂, at 28 °C without agitation. One hundred µL of overnight cultures were transferred in fresh medium (20 mL for BHI, 9 mL for MRS) and mixed with 10 µL of the viral fraction to be enriched. The growth conditions were the same except for the temperature of incubation which was lowered to 23 °C for cultures in BHI and MB, as we determined that 28 °C was suboptimal for phage infection in these media.

After centrifugation at 5000 × *g* for 10 min at 4 °C, the supernatant was filtrated using 0.22 µm polyethersulfone syringe filters (Sartorius, Göttingen, Germany). Then, 100 µL of the filtrate were used to infect the tested-bacterial isolate through a double-layer spot assay [30]. Double-layer plates were prepared as follows. According to the bacterium tested, the sublayer was made of BHI, MRS or MB containing agar (1.5%), MgSO₄ (10 mM) and CaCl₂ (1 mM). Thirty to one hundred µL of overnight culture of the tested bacterial isolate were added to 5 mL of molten top agarose made of BHI, MRS or Marine broth mixed with 0.3% agarose (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) and supplemented with 10 mM MgSO₄ and 1 mM CaCl₂ that were poured on the respective agar plates. The double layer plates were allowed to dry before spotting the enriched phages and were then incubated overnight at 23 °C (28 °C and under anaerobic conditions for MRS). Lysis zones were picked and resuspended in 100 µL of sodium-magnesium (SM) buffer (50 mM Tris pH7.5, 10 mM MgSO₄, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂). Phages were streaked on the same bacterial isolate, and plaques were picked. This step was repeated twice to obtain pure phage stocks. Phage titration was performed using a classical double layer plaque assay [30]. The protocol is close to the spot assay used for phage isolation. One hundred µL of serial dilutions of the phage stock were mixed with the bacterial host and top agarose before pouring on the appropriate agar-medium. After overnight incubation, lysis plaques were enumerated. Phage stocks were stored at 4 °C.

In order to obtain large phage stocks, 100 µL of the pure phages (10⁴ to 10⁶ PFU/mL, depending on phages) were mixed with thirty to one hundred µL of an overnight culture of the propagation host (depending on the strain) and poured on a new double layer plate to obtain confluent lysis. Five ml of SM buffer were poured onto the plates, which were then incubated for one hour at room temperature. The buffer and the top agarose layer were then harvested with a sterile spreader and transferred to a 50 mL tube. After centrifugation for 10 min at 5000 × *g* at 4 °C, the supernatant was filtrated. Phage titration was performed as described above. Phage stocks (at least 10⁸ PFU/mL) were stored at 4 °C until use.

2.4. Transmission Electronic Microscopy (TEM)

Two milliliters of high titer phage stocks (minimal concentration of 10⁸ PFU/mL) were centrifuged for 1 h at 20,000 × *g* and 4 °C. Phage pellets were separately washed and centrifuged for 1 h at 20,000 × *g* and 4 °C two times in ammonium acetate (AA) buffer (0.1 M Ammonium Acetate pH 7) before being resuspended in 100 µL of AA buffer. Ten microliters of each phage suspensions were spotted onto a Formvar carbon coated copper

grid. Particles were allowed to adsorb to the carbon layer for 5 min, and the excess of liquid was removed. Ten microliters of a staining uranyl acetate solution (1%) were then spotted to the grid for 10 s, and the excess of liquid was removed again. The grid was imaged at 80 kV in a Hitachi HT7700 transmission electron microscope. The dimensions of each phage were determined by averaging the measurements of five separate particles using ImageJ software [31].

2.5. Viral Genomic DNA Extraction and Sequencing

Phage stocks at a minimal concentration of 10^8 PFU/mL were used for DNA extraction following the protocol described in [32] with slight modifications. The DNeasy Blood & Tissue Kit from Qiagen (Hilden, Germany) was replaced by the NucleoSpin Tissue kit from Macherey-Nagel (Hoerdt, France). Final concentrations were measured with a Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and the DNA integrity was analyzed on a TapeStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using Genomic DNA Screen Tape. Phage DNA was further sequenced using both Illumina and Nanopore technologies.

Regarding Illumina technology, library preparation and sequencing were handled by Eurofins Genomics (Konstanz, Germany). A minimum of 5 million of 150 bp paired-end reads were produced for each phage using a NovaSeq platform (Illumina, San Diego, CA, USA).

For Nanopore sequencing, barcoded genomic DNA sequencing was performed according to the specifications of the Native Barcoding protocol version “NBE_9065_v109_revV_14 Aug2019” (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK). A total of 1–1.5 µg purified DNA from each phage were used to prepare sequencing libraries using the standard Ligation Sequencing Kit SQK-LSK109 (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK), increasing the DNA repair and end-prep incubation times to 30 min. Sequencing was conducted on MinION Mk1C with FLO-MIN106 (R 9.4.1) flowcells (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK).

2.6. Phage Genome Assembly

A first draft assembly was constructed from Nanopore reads as described below. The quality of Nanopore reads was evaluated using FastQC (v0.11.8; <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>, accessed on 19 April 2022), MultiQC (v1.8) [33] and MinionQC [34]. Porechop (v0.2.3) was used to remove remaining barcodes [35]. After a subsampling of trimmed long reads by Tricycler [36] (v0.4.2; `-count 8`), genome assembly was performed with three different assemblers, namely Unicycler [37] (v0.4.4; with `-long` option), Flye [38] (v2.7.1; with `-nano-raw -genome-size -plasmids` options) and Raven [39] (v1.3.0; default parameters). Then, cleaned contigs of each sample were clustered with Tricycler according to expected size by combining intermediate assemblies of the three tools cited above. We kept the contigs clustered by Tricycler after a manual curation according to the most highly represented clusters and the expected genome size. In accordance with the manual, we then reconciled selected clusters with Tricycler reconcile using cleaned Nanopore reads, aligned sequences with Tricycler msa, partitioned reads with Tricycler partition and finally produced a consensus with Tricycler consensus. Contigs were first polished using trimmed Nanopore reads with Medaka (<https://github.com/nanoporetech/medaka>, accessed on 19 April 2022) (v1.0.3; `-m r941_min_high_g360` option). Then, short Illumina reads were used to polish again the draft assembly with Pilon (v1.23) [40]. For this, reads were first trimmed with Trimmomatic v0.39 [41] (options: `ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10, LEADING:3, TRAILING:3, SLIDINGWINDOW:4:20, MINLEN:125`). The final quality of the assembled contigs was assessed with QUAST v5.0.2 [42].

A second-draft assembly was produced from trimmed Illumina reads only and assembled with SPAdes (v3.13.1) with the `-only-assembler` option and increasing kmer values `-k 21,33,55,77,99,127` [43]. PhageTerm [44] was used to predict the genomic termini and phage packaging strategy using both trimmed Illumina reads and corresponding assembled contigs. Automatically rearranged contigs were thus obtained and aligned with the contigs

originating from the first draft assembly. When necessary, this second assembly was used to correct the first assembly manually and produce the final phage genomes.

2.7. Structural and Functional Annotation

For each polished genome, open reading frames (ORFs) were predicted with the RAST server [45] with the following parameters: Domain = Viruses, Genetic code = 11, RAST annotation scheme = RASTtk. Afterwards, each ORF was manually annotated using a combination of the following tools: (i) HHpred against the PDB-mmCIF70_12_Oct database [46], (ii) Blast [47] against the nr/nt database from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and the Conserved Domains Database (CDD) [48,49], (iii) PHROGs [50] and (iv) Virfam [51]. The presence of virulence genes was searched by comparing all the coding DNA sequences (CDS) to the Virulence Factor DataBase [52] by BlastX (thresholds: 90% identity, 60% coverage). The presence of antibiotic resistance genes were searched using ResFinder [53] using the same thresholds.

2.8. Genome-Based Classification of Phages

Assembled genomes were compared to the nr/nt NCBI database using BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, accessed on 21 April 2022), with and without specifying the “Viruses” option in the search. According to the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), two phages were considered to respectively belong to the same species or genus if the genome were reciprocally more than 95% or 70% identical at the nucleotide level over their (almost) full genome length [54]. These taxonomic values were calculated using BLASTn multiplying % identity by % coverage, which is one of the tools proposed in [54]. In order to evaluate putative higher phage taxonomic affiliation (subfamily or family ranks), we used the ViPTree web server [55] (<https://www.genome.jp/viptree>, accessed on 22 April 2022) which is a proteome-based clustering tool that generates “proteomic trees” of phage genome sequences based on genome-wide similarities computed by tBLASTx. Finally, comparative genomics were performed between the newly sequenced phages and their closest relative(s) with Easyfig (v2.2.5) [56]. The shed of red lines precisely connects regions of adjacent phages that have tBLASTx identity from 30% to 100% over at least 100 or 150 bp depending on phage genomes.

2.9. Host Range Determination

To assess the host range of the newly isolated phages, we used a set of bacterial strains and isolates listed in Table 1. Briefly, we tested the sensitivity of each phage against (i) up to 13 isolates from the washed-rind cheese (see Section 2.2.2) belonging to the same bacterial species as the propagation strain where possible (randomly selected), (ii) collection strains isolated from other dairy products or different environments and (iii) collection strains belonging to the same genus but different species as the propagation strain. Bacterial sensitivity was assessed through a spot assay experiment, as described in [57].

Table 1. Bacterial hosts tested for their sensitivity to isolated phages.

Strain or Isolate	Isolation Source	Tested Phages
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i> G16	Studied cheese	
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i> G26	Studied cheese	
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i> G33	Studied cheese	
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i> G43	Studied cheese	
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i> G51	Studied cheese	
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i> G52	Studied cheese	Voltaire and Montesquieu
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i> G53	Studied cheese	
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i> G65	Studied cheese	
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i> G119	Studied cheese	
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i> G135	Studied cheese	
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i> G183	Studied cheese	

Table 1. Cont.

Strain or Isolate	Isolation Source	Tested Phages
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i> G186	Studied cheese	Voltaire and Montesquieu
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i> G201	Studied cheese	
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i> DSM 16368	Reblochon cheese	
<i>Glutamicibacter bergerei</i> DSM 16367	Camembert cheese	
<i>Glutamicibacter nicotianae</i> DSM 20123	Air of tobacco warehouses	
<i>Glutamicibacter uratoxydans</i> DSM 20647	Humus soil	
<i>Brevibacterium aurantiacum</i> B20	Studied cheese	Rousseau
<i>Brevibacterium aurantiacum</i> B67	Studied cheese	
<i>Brevibacterium aurantiacum</i> 2M23	Cheese	
<i>Brevibacterium aurantiacum</i> FME9	Cheese	
<i>Brevibacterium aurantiacum</i> FME34	Cheese	
<i>Brevibacterium aurantiacum</i> FME43	Cheese	
<i>Brevibacterium aurantiacum</i> FME45	Cheese	
<i>Brevibacterium aurantiacum</i> FME48	Cheese	
<i>Brevibacterium aurantiacum</i> FME49	Cheese	
<i>Brevibacterium aurantiacum</i> ATCC 9174	Cheese	
<i>Brevibacterium aurantiacum</i> ATCC 9175 (DSM 20426)	Camembert cheese	
<i>Brevibacterium aurantiacum</i> 25	Camembert cheese	
<i>Brevibacterium aurantiacum</i> 299	Camembert cheese	
<i>Brevibacterium aurantiacum</i> B3	Langres cheese	
<i>Brevibacterium aurantiacum</i> CAM-4	Camembert cheese	
<i>Brevibacterium aurantiacum</i> CAM 12C	Camembert cheese	
<i>Brevibacterium casei</i> CIP 102111 (DSM 20657)	Cheese	
<i>Brevibacterium epidermidis</i> NCDO 2286T (DSM 20660)	Skin	
<i>Brevibacterium iodinum</i> ATCC 49514T (DSM 20626)	Skin	
<i>Brevibacterium linens</i> ATCC 9172 (DSM 20425)	Cheese	
<i>Brevibacterium sandarakinum</i> DSM 22082	Wall surface	
<i>Leuconostoc falkenbergense</i> 90	Studied cheese	Diderot
<i>Leuconostoc falkenbergense</i> 91	Studied cheese	
<i>Leuconostoc falkenbergense</i> 92	Studied cheese	
<i>Leuconostoc falkenbergense</i> 93	Studied cheese	
<i>Leuconostoc falkenbergense</i> 96	Studied cheese	
<i>Leuconostoc falkenbergense</i> 98	Studied cheese	
<i>Leuconostoc falkenbergense</i> 99	Studied cheese	
<i>Leuconostoc falkenbergense</i> 114	Studied cheese	
<i>Leuconostoc falkenbergense</i> 116	Studied cheese	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 88	Studied cheese	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 89	Studied cheese	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 95	Studied cheese	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 97	Studied cheese	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 101	Studied cheese	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 102	Studied cheese	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 107	Studied cheese	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 108	Studied cheese	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 113	Studied cheese	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 115	Studied cheese	
<i>Leuconostoc citreum</i> MSE2	Milk	
<i>Leuconostoc lactis</i> NCW1	Cheese	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> DSM 20346	Cheese	
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> MSE7	Cheese	
<i>Psychrobacter aquimaris</i> 15	Studied cheese	D'Alembert
<i>Psychrobacter aquimaris</i> 54	Studied cheese	
<i>Psychrobacter aquimaris</i> 59	Studied cheese	
<i>Psychrobacter aquimaris</i> 60	Studied cheese	
<i>Psychrobacter aquimaris</i> 69	Studied cheese	
<i>Psychrobacter aquimaris</i> 87	Studied cheese	
<i>Psychrobacter aquimaris</i> 124	Studied cheese	

Table 1. Cont.

Strain or Isolate	Isolation Source	Tested Phages
<i>Psychrobacter aquimaris</i> 129	Studied cheese	
<i>Psychrobacter aquimaris</i> 184	Studied cheese	
<i>Psychrobacter aquimaris</i> 200	Studied cheese	
<i>Psychrobacter cibarius</i> 132	Studied cheese	
<i>Psychrobacter cibarius</i> 139	Studied cheese	
<i>Psychrobacter cibarius</i> 140	Studied cheese	
<i>Psychrobacter cibarius</i> 157	Studied cheese	
<i>Psychrobacter cibarius</i> 158	Studied cheese	
<i>Psychrobacter cibarius</i> 160	Studied cheese	
<i>Psychrobacter cibarius</i> 165	Studied cheese	D'Alembert
<i>Psychrobacter cibarius</i> 171	Studied cheese	
<i>Psychrobacter cibarius</i> 181	Studied cheese	
<i>Psychrobacter cibarius</i> 198	Studied cheese	
<i>Psychrobacter aquimaris</i> ER15 174 BHI7	Saint-Nectaire cheese	
<i>Psychrobacter celer</i> DSM 23510	Munster cheese	
<i>Psychrobacter cibarius</i> DSM 16327	Epoisses cheese	
<i>Psychrobacter faecalis</i>	Livarot cheese	
<i>Psychrobacter namhaensis</i> 1439	Camembert cheese	

2.10. Effect of Temperature on Phage Infection

Serial dilutions for each phage (from pure stocks to 10^{-8}) were performed in SM Buffer and spotted (5 μ L) on five double-agar plates containing a pure culture of the appropriate recipient strain (*G. arilaitensis* G65 for Volaire, *G. arilaitensis* G51 for Montesquieu, *B. aurantiacum* B67 for Rousseau, *L. falkenbergense* 91 for Diderot or *Psychrobacter aquimaris* 87 for D'Alembert). Plates were incubated for 24 to 48 h either at 12 °C, 16 °C, 20 °C, the original temperature of isolation (25 °C for Voltaire, Montesquieu, Rousseau and D'Alembert; 28 °C for Diderot) or 30 °C. For each temperature, the phage titer was determined by counting lysis plaques at the lowest possible dilution and then compared to that obtained at the phage isolation temperature (25 °C or 28 °C).

2.11. Identification of Phage Reservoirs in a Dairy Plant

Five sample types were collected in the production unit producing the studied surface ripened cheese: milk after inoculation with acidification ferments, salting tables (after cleaning), cheese turning line (after cleaning), and two washing solutions. For each sample type, three replicates were collected at weekly intervals during May 2021, that is, one-and-a-half years after the first viral extractions from the cheese rind used for the isolation of phages.

A virome of each sample was prepared using a procedure adapted to each sample type. Liquid samples (milk and the two washing solutions, 50 mL each) were centrifuged at $300 \times g$ for 10 min at 4 °C, and the supernatant was filtrated on 0.22 μ m polyethersulfone syringe filters (Sartorius). Wipes from the solid surfaces (salting tables and cheese turning lines) were placed in flasks containing 100 mL of SM buffer and agitated overnight at 4 °C. They were then manually and aseptically wrung, and the liquid was filtered on 0.22 μ m polyethersulfone syringe filters (Sartorius). After filtration, phage precipitations were performed by adding 10% (*w/v*) polyethylene glycol 8000 (Sigma Aldrich) and 1 M NaCl. After an overnight incubation at 4 °C, precipitates were centrifuged at $6000 \times g$ for 60 min at 4 °C. The pellet was resuspended in 2 mL of SM buffer and stored at 4 °C.

To search for phages in the collected samples from the dairy plant, spot assays were performed. For this, we selected as recipients the bacterial hosts sensitive to the five phages isolated from the cheese rind. Briefly, 10 μ L of the viral extract from the production sample were spotted on a double-agar plate containing a pure culture of either *G. arilaitensis* G65, *G. arilaitensis* G51, *B. aurantiacum* B67, *L. falkenbergense* 91 or *Psychrobacter aquimaris* 87 bacterial isolates (Table 1). In cases where no lysis was detected by direct plating, a phage enrichment

was performed by adding 10 µL of the viral extract from the production sample to the tested strain in 20 mL of the appropriate broth medium and incubation overnight at 23 °C. The culture supernatant was then filtered and used for the spot-testing.

When present, plaques were picked with a sterile loop and resuspended in 30 µL of SM buffer. Then, PCR amplification using diagnostic primers for each of our 5 characterized phages (Table 2) and Sanger sequencing (Eurofins Genomics) was conducted to test whether the phage detected in the sample corresponded to the one isolated from the cheese rind. Thermal cycling conditions were applied as follows: (i) 5 min at 95 °C for initial denaturation, (ii) 30 cycles of 30 s at 95 °C for denaturation, 30 s at the appropriate annealing temperature, 30 s at 72 °C for elongation and (iii) 5 min at 72 °C to ensure final elongation. DNA amplicons were assessed on 1.5% *w/v* agarose gel and sent for Sanger sequencing to Eurofins Genomics (Köln, Germany). Raw sequence reads were cleaned under Chromas version 2.6.6 and aligned to the targeted sequences from isolated phage genomes.

Table 2. PCR primers targeting specific phage genes.

Phage	Primer	Targeted CDS	Product	Sequence (5'-3')	Annealing Temperature (°C)	Amplicon Size (bp)
Voltaire	VOLT_F	VOLT_18	Pre-neck protein	actacctaccctgccctaa ttcgttgaccagcacacaag	57	705
	VOLT_R					
Rousseau	ROUS_F	ROUS_20	Receptor-binding protein	ggcgggttcggagggtattag gaaccaaacctcatcgcca	57	877
	ROUS_R					
Diderot	DID_F	DID_20	Tail tape measure protein	aaaactgctgtgactcgtgg caccaaacacgccagagaaa	57	931
	DID_R					
D'Alembert	ALEM_F	DAL_18	RNA ligase	tggactactaatgcaggatcgtg tcaacctcaaagccatctct	57	714
	ALEM_R					
Montesquieu	MONT_F	MONT_53	DNA polymerase I	tgacggcaagttcaatcagc gctggttcggagtagtgtct	57	683
	MONT_R					

3. Results

3.1. Construction of a Bacterial Collection from the Cheese Surface

Enumeration of total viable counts on BHI, lactic acid bacteria on MRS and yeasts on YEGC gave 5.1×10^9 CFU/g, 1.7×10^7 CFU/g and 2.2×10^8 CFU/g of the cheese rind, respectively, was conducted. From the three sampled cheeses, 203 bacterial strains were isolated on four different media and selected on the basis of colony morphology in order to maximize the final diversity present in the collection. After purification, bacteria were identified according to the full-length sequence of the SSU rRNA gene. Most isolates belonged to six species, i.e., *Glutamicibacter arilaitensis* (78 isolates), *Psychrobacter cibarius* (46), *Psychrobacter aquimaris* (25), *Leuconostoc falkenbergense* (19), *Leuconostoc mesenteroides* (10) and *Halomonas nigrificans* (9). Remaining bacterial isolates corresponded to sub-dominant species such as *Brevibacterium aurantiacum* (2), *Staphylococcus equorum* and *Vibrio hibernica*. This collection of bacterial isolates was used to isolate bacteriophages from the same samples.

3.2. Five Bacteriophages Isolated from the Cheese Surface

We explored the presence of bacteriophages in the rind of the same cheese used for bacterial sampling by screening the bacterial collection using a classical double-layer spot assay (see Methods).

For three of the six most frequently isolated species, no phages were isolated, namely *Psychrobacter cibarius*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Halomonas nigrificans*. Four virulent bacteriophages could be isolated, however, from the three other dominating species: two *Glutamicibacter arilaitensis* infecting phages, Voltaire (infecting isolate G65) and Montesquieu (infecting isolate G51), one *Leuconostoc falkenbergense* infecting phage, Diderot (infecting isolate 91) and one *Psychrobacter aquimaris* infecting phage, D'Alembert (infecting isolate 87).

Interestingly, we could also isolate a phage infecting the sub-dominant species *Brevibacterium aurantiacum*, Rousseau (on isolate B67).

3.2.1. All Cultivable Phages Are Tailed Phages

Electron micrographs of these phages showed that they were all tailed and therefore belonged to the *Caudoviricetes* class (Figure 1). Their main morphological characteristics are summarized in Table 3. D’Alembert is a myophage (long, contractile tail); Voltaire is a podophage (i.e., it has a short tail), while Rousseau, Diderot and Montesquieu are siphophages (long non-contractile tail).

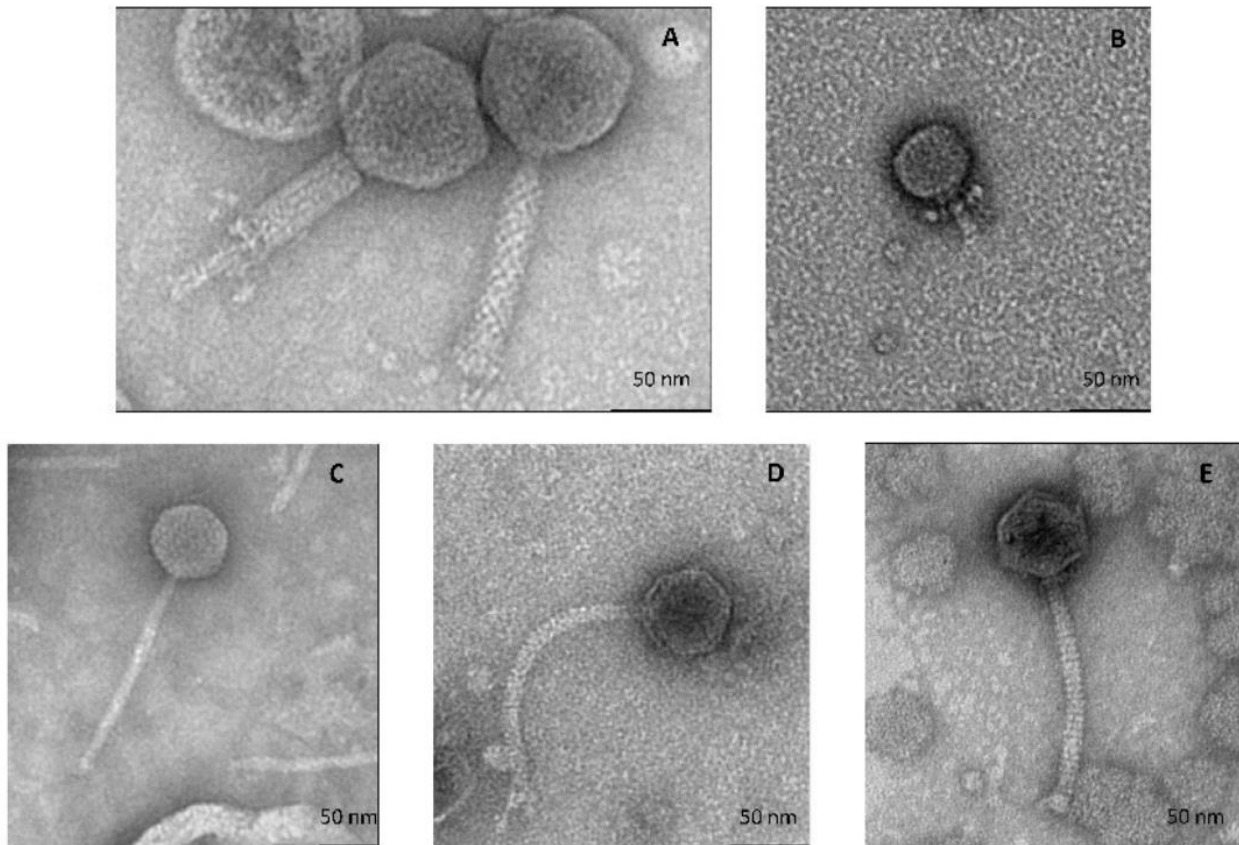


Figure 1. Transmission electron micrographs of 5 phages isolated from cheese rind. (A), *Psychrobacter* phage D’Alembert (contracted form at left), (B) *Glutamicibacter* phage Voltaire, (C) *Glutamicibacter* phage Montesquieu, (D) *Brevibacterium* phage Rousseau and (E) *Leuconostoc* phage Diderot.

Table 3. Morphologic characteristics of the isolated phages.

Phage	Capsid Size (nm ± SD ¹)	Tail Size (nm ± SD)	Morphotype	Plaque Morphology
D’Alembert	88 ± 2	113 ± 2.6	myophage	Clear, small
Voltaire	47 ± 1.1	30 ± 3.8	podophage	Clear, small
Montesquieu	64 ± 1.8	184 ± 5.5	siphophage	Clear, large
Rousseau	62 ± 5.5	177 ± 15.6	siphophage	Clear, large
Diderot	57 ± 4.3	141 ± 0.9	siphophage	Clear, large

¹ SD = Standard deviation.

3.2.2. All Five Phages Have Narrow Host Ranges

Each phage host spectrum was evaluated by spot testing using three distinct groups of strains or isolates, namely: (i) isolates of the same species as the propagation strain obtained from the same cheese, (ii) collection strains belonging to the same species as the propagation strain but obtained from other sources (other dairy products or various environments) and (iii) collection strains belonging to the same genus but different species as the propagation strain (Table 4).

Table 4. Host spectrum of the 5 tested phages.

Phage	Propagation Strain	Sensitive Isolates/Tested Isolates (Same Species as the Host)		Sensitive Species/Tested Species (Same Genus but Different Species as the Host)
		Isolated from the Studied Cheese	From Other Sources	
D'Alembert	<i>Psychrobacter aquimaris</i> 87	3/10	0/5	0/4
Voltaire	<i>Glutamicibacter arilaitensis</i> G65	2/13	0/1	0/3
Montesquieu	<i>Glutamicibacter arilaitensis</i> G51	7/13	0/1	0/3
Rousseau	<i>Brevibacterium aurantiacum</i> B67	1/2	0/16	0/5
Diderot	<i>Leuconostoc falkenbergense</i> 91	7/9	0/1	0/4

The five newly isolated phages all had a narrow host range, being able to infect only one to seven isolates of a single species and all originating from the studied cheese. Interestingly, the infection profiles of Voltaire and Montesquieu phages, both infecting *G. arilaitensis*, were completely different (Table S1).

3.2.3. Effect of Temperature on Phage Infection

Phage infections were performed at different incubation temperatures ranging from 12 °C to 30 °C (Figure S1). The infection success of *Psychrobacter* phage D'Alembert and *Glutamicibacter* phage Montesquieu was barely constant from 12 to 25 °C but dropped at 30 °C (almost 2 and 4 logs for D'Alembert and Montesquieu, respectively). A moderate reduction in the titer was observed for *Glutamicibacter* phage Voltaire (almost 1 log) at 25 and 30 °C compared to lower temperatures, and, on the contrary, at 12 °C for *Leuconostoc* phage Diderot compared to higher temperatures. *Brevibacterium* phage Rousseau infection was not affected by the temperature within the tested range.

3.2.4. Uncovering Three Completely New Phage Genomes

The genomes of the five phages isolated from the cheese rind were sequenced using both Nanopore and Illumina technologies. The main sequencing and assembly information are summarized in Table 5. Briefly, the number of raw Nanopore reads obtained was comprised between 15 k and 1.7 M, and the number of raw Illumina reads between 5.5 M and 8.9 M. As expected, Nanopore sequencing produced long reads, from 3074 to 9872 bases on average, which facilitated complete genome assembly.

Genome sizes ranged from 18 kb for *Glutamicibacter* phage Voltaire to 92 kb for *Psychrobacter* phage D'Alembert. Gene density was high (1.6 genes/kb in average), as is usual for phage genomes, although we noticed that Montesquieu had a slightly lower gene density (1.3 genes/kb). For *Glutamicibacter* phage Montesquieu, the assembly of Nanopore reads did not produce a unique contig.

Table 5. Global metrics around sequencing and assembly steps.

Phage	Raw Reads Count Illumina	Raw Reads Count Nanopore	Average Size of Reads (bp) Illumina	Average Size of Reads (bp) Nanopore	Number of Contigs	Genome Size (kb)	Number of ORFs	Terminal Repeat Size (bp)	Best Blast Hit ²
Voltaire	8.9×10^6	63,494	2 × 150	4320	1	18.4	26	176	<i>Brevibacterium</i> phage Cantare (83.33% id 1% cov)
Montesquieu ¹	5.6×10^6	-	2 × 150	-	1	47.7	62	-	<i>Arthrobacter</i> phage Triplej (75.25% id 2% cov)
Rousseau	5.5×10^6	15,649	2 × 150	3576	1	40.2	71	-	<i>Siphoviridae</i> sp. Isolate ctmmc7 (75.54% id 0% cov)
Diderot	6.9×10^6	1,736,125	2 × 150	3074	1	27.1	40	-	<i>Leuconostoc</i> phage LN03 (98.20% id 98% cov)
D'Alembert	7.1×10^6	115,763	2 × 150	9872	1	92.5	158	5719	<i>Vibrio</i> phage vB_Vham_VH-8 (83.95% id 34% cov)

¹ As explained in Section 2, Montesquieu genome assembly was obtained from Illumina reads only. ² Accession numbers for each related phage: *Brevibacterium* phage Cantare: MK016493; *Siphoviridae* sp. Isolate ctmmc7: BK019734; *Leuconostoc* phage PhilN03: NC_024390; *Vibrio* phage vB_Vham_VH-8: MN497415; *Arthrobacter* phage Triplej: MN234178.

The completeness of the sequenced genomes was further investigated (Table 6). Voltaire was complete as indicated by the presence of 176 bp inverted terminal repeats, and D’Alembert as well, with 5.7 kb-long direct terminal repeats (DTRs). Interestingly, D’Alembert DTRs were found thanks to PhageTerm, whereas, in the single contig generated upon the SPAdes assembly from Illumina reads, one of the repeats was missing. Regarding Rousseau and Montesquieu, Illumina assembly displayed a single contig with 127 bp artefactual DTRs, indicating completeness as well. Finally, Diderot was not assembled into a single contig from Illumina reads, but its assembly from Nanopore reads produced a single 27.1 kb contig, highly similar to a known phage over its total length, suggesting genome completeness (see below). Overall, both assemblies gave complementary information and allowed for conclusions on the completeness of 4 out of 5 phage genomes and suggested completion for the last one. With respect to encapsidation modes, PhageTerm predicted Rousseau and Diderot as cos phages with 3’ extensions, Montesquieu as a pac phage, and D’Alembert uses long DTRs.

Table 6. Completeness and encapsidation strategy for the five phages.

	Illumina Only Assembly			Final assembly	
	Size in bp	Terminal Repeat	PhageTerm Prediction: Boundaries and Encapsidation Strategy	Size in bp after Polishing	Terminal Repeat
Voltaire	18,300	/	Redundant, permuted and unknown ¹	18,418	176 bps ITR
Montesquieu	47,703	127 bp DTR, assembly artefact removed	Headful (pac)	47,576	/
Rousseau	40,294	127 bp DTR, assembly artefact removed	Cos (3’)	40,167	/
Diderot	/	/	Cos (3’)	27,116	/
D’Alembert	86,864	127 bp DTR, assembly artefact removed	5719 bps DTR (long)	92,456	5719 bps DTR

¹ phi29-like phage packaging strategy not predictable using PhageTerm [44].

Each genome was further characterized by performing manual annotation of each ORF. We used the ViPTree webserver to perform comparisons of global protein content of our phages with those available as of March 2022 in this interface (Figures 2 and 3). Then, each phage genome was aligned to one or two close relatives with Easyfig (Figure 4). A table gathering the eleven auxiliary metabolic genes (AMGs) detected can be found in

Supplementary Materials (Table S2). Here, AMGs are encoded by all phages but Voltaire. Finally, no virulence genes nor antibiotic resistance genes were detected on the five newly assembled genomes.

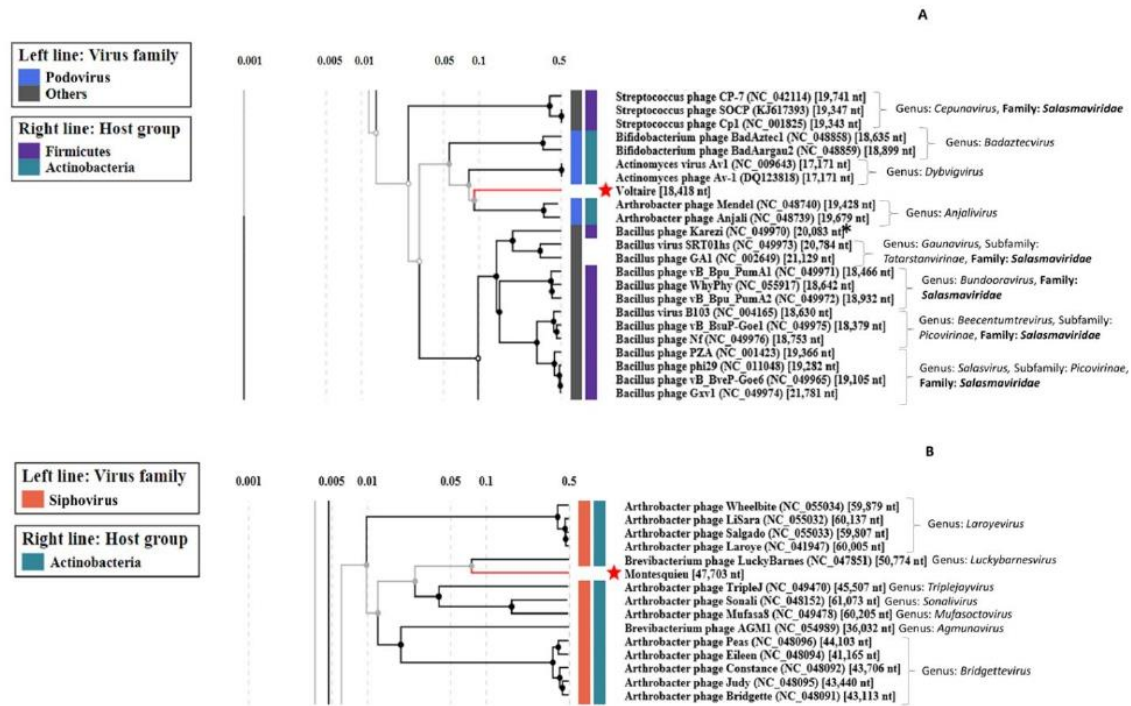


Figure 2. Screenshots of proteomic trees of (A) Voltaire and (B) Montesquieu and related phages, computed with ViPTree. *: Genus: Karezivirus, Subfamily: Tatarstanvirinae, Family: Salasmaviridae. Red stars indicate the position of the newly sequenced phage genomes.

Glutamicibacter phage Voltaire encodes 26 ORFs, of which 14 had function predictions. It has no AMGs but possesses three genes coding for enzymes involved in lysis: an amidase (VOLT_14), an endopeptidase (VOLT_19) and a holin (VOLT_21). It represents the first completely new phage genome uncovered by the study. According to ViPTree, the closest phages to Voltaire are Mendel and Anjali, two small and closely related podophages infecting *Arthrobacter* (Figure 2A). Voltaire is more distantly related to *Actinomyces* podophage Av-1, sharing weak homologies with the polymerase B (VOLT_6), major capsid protein (VOLT_9) and major tail protein (MTP, VOLT_15) (Figure 4A). The ViPTree positioning leads to proposing that *Glutamicibacter* phage Voltaire may represent a new genus within the *Salasmaviridae* family.

Glutamicibacter phage Montesquieu comprises 62 ORFs of which 36 have function predictions. It possesses two predicted AMGs, an ABC transporter (MONT_40) and an aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (MONT_41). No significant BLASTn hits were obtained by comparing the Montesquieu sequence to the NCBI database (nr and viruses), making this latter the second new phage characterized in the study. According to the ViPTree analysis, the closest phages to Montesquieu are a clade of siphophages infecting *Brevibacterium* or *Arthrobacter*, from which Montesquieu probably represents a new genus (Figure 2B). The genomic comparison of Montesquieu with its two closest ViPTree neighbors, *Arthrobacter* phage TripleJ and *Brevibacterium* phage LuckyBarnes showed a similar genetic organization but little sequence identity at the protein level, mostly within the structural module (Figure 4B). Montesquieu owns proteins related to the tail but no sheath protein, which is consistent with the siphophage morphotype observed in TEM.

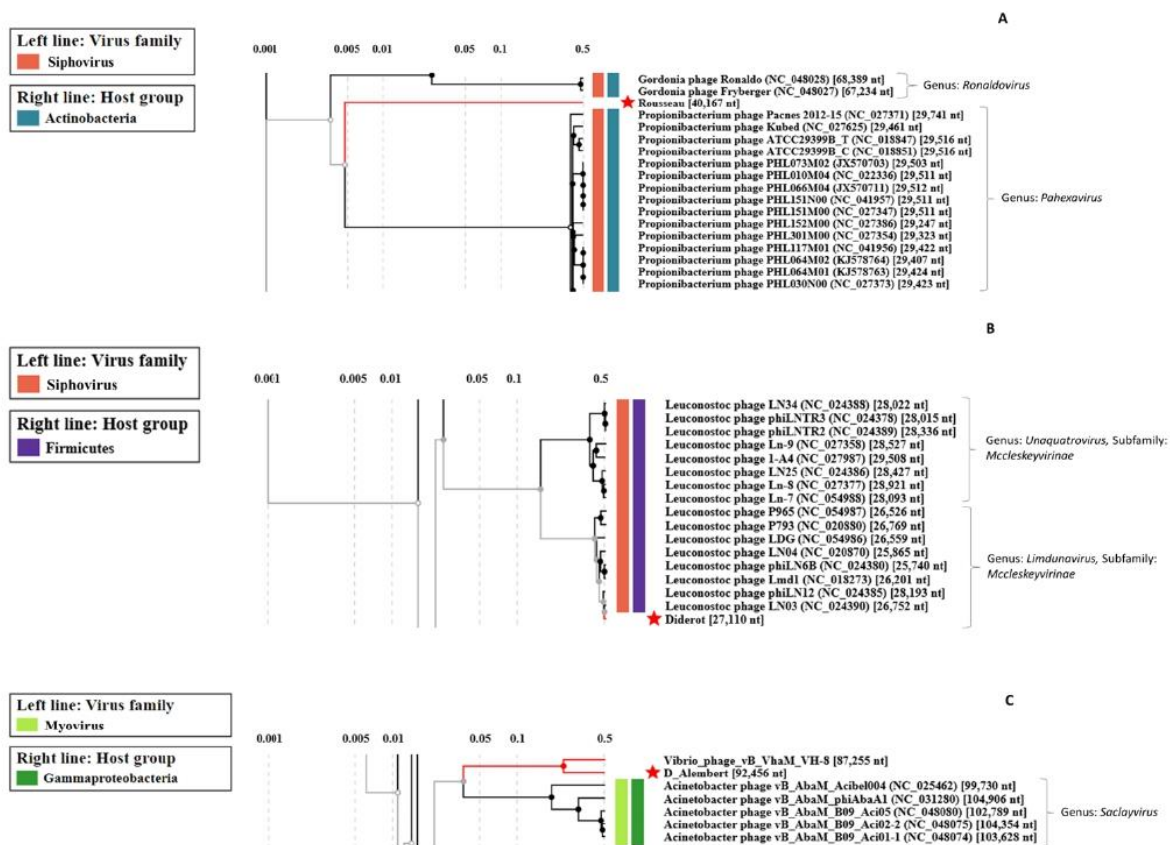


Figure 3. Screenshots of proteomic trees of (A) Rousseau, (B) Diderot, (C) D'Alembert and related phages, computed with ViPTree. Red stars indicate the position of the newly sequenced phage genomes.

Brevibacterium phage Rousseau has 71 ORFs of which 41 have functional predictions. It possesses three AMGs: a putative glutaminyl cyclase (ROUS_25), a thioredoxin-like protein (ROUS_48) and an S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase (ROUS_51). With no homologues in the NCBI database, Rousseau is the third completely new phage uncovered by the study and represents a new genus. According to ViPTree, Rousseau is only very distantly related to phages infecting *Propionibacterium* (Figure 3A). A comparison of the genetic maps of Rousseau and AGM1, a phage previously isolated from a smear-ripened cheese wash solution, shows similar organizations despite their lack of genetic relatedness (Figure 4C). The Rousseau tail module supports its siphophage morphological characteristics observed in TEM.

Psychrobacter phage D'Alembert comprises 158 ORFs of which 56 have functional predictions. It has several AMGs, namely: a nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase (DAL_25), an Ntn_hydrolase-like protein (DAL_45), an S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase (DAL_53), a putative chaperonin (DAL_56), an endolytic peptidoglycan transglycosylase (DAL_57), a putative antitoxin (DAL_112) and a thioredoxin glutathione reductase (DAL_125). It represents a new phage genus, sharing a third of its genome with *Vibrio* phage vB_VhaM_VH-8 (84% nt identity). According to ViPTree, both phages, D'Alembert and VH-8, are distantly related to myophages infecting *Acinetobacter* (Figure 3C). Genomic comparison confirmed that D'Alembert is closer to VH-8 than to *Acinetobacter* phage vB_AbaM_Acibel004, with which it showed only little gene synteny and sequence homology for a few proteins (Figure 4E). The fact that a sheath protein is encoded on the D'Alembert genome supports the direct myophage morphotype observation performed using TEM.

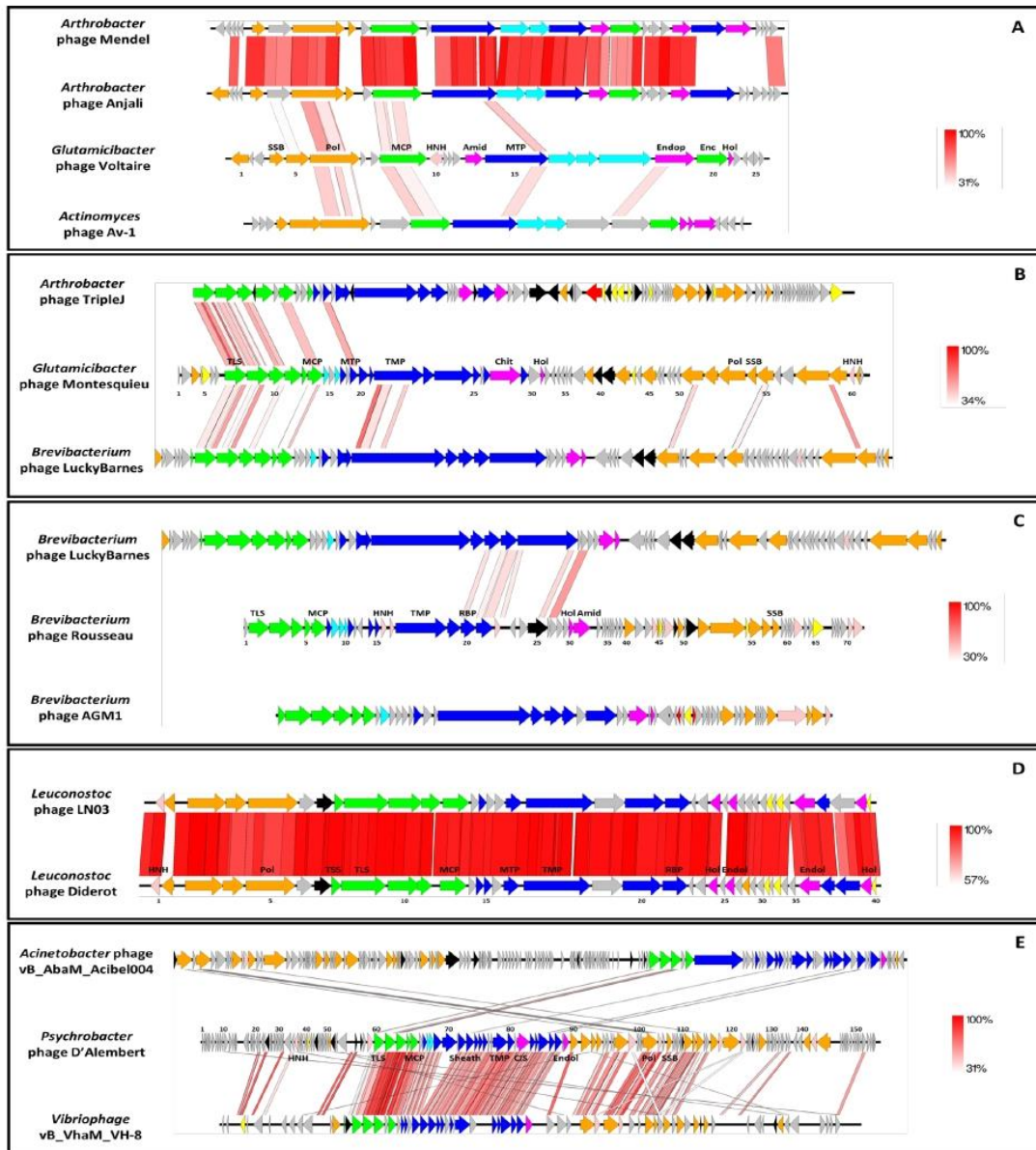


Figure 4. Schematic representation of the phage genomes and comparisons to their closest relatives. (A) *Glutamicibacter* phage Voltaire. (B) *Glutamicibacter* phage Montesquieu. (C) *Brevibacterium* phage Rousseau. (D) *Leuconostoc* phage Diderot. (E) *Psychrobacter* phage D’Alembert. Each line represents a phage genome, and each arrow represents an ORF. Red shade lines and percentages indicate tBLASTx identity between two genes. A minimum BLAST hit length of 100 nt (150 for d’Alembert) and with at least 30% tBLASTx identity were set. Gene functions are color-coded and detailed (yellow: transcriptional regulation, orange: DNA metabolism, green: DNA packaging and head, light blue: head to tail, dark blue: tail, pink: HNH endonuclease, fuchsia: lysis, black: auxiliary metabolic genes, grey: hypothetical proteins). List of abbreviations: Amid = amidase; Chit = chitinase; CIS = Contractile Injection System; Enc = encapsidation protein; Endop = endopeptidase; Endol = endolysin; HNH = HNH homing endonuclease; Hol = holin; MCP = Major Capsid Protein; MTP = Major Tail Protein; Pol = polymerase; RBP = Receptor-Binding Protein; SSB = Single-Strand Binding protein; TLS = Terminase Large Subunit; TMP = Tail tape Measure Protein; TSS = Terminase Small Subunit.

Leuconostoc phage Diderot has 40 ORFs of which 29 have a functional prediction. It shares a very strong nucleotidic identity with *Leuconostoc* siphophage LN03 (98% identity and 98% coverage for both genomes). Both Diderot and LN03 harbor an AMG coding for a ribonuclease Z (DID_7 and LN03_7). A remarkable difference among the genomes is located on LN03_2 and DID_2: although both proteins are predicted endodeoxyribonucleases, they share less than 30% protein identity (Figure 4D), suggesting a recent exchange. Based on ICTV taxonomic criteria, Diderot belongs to the same species as LN03, the *Limdunavirus* genus and the *McCleskeyvirinae* subfamily, which is confirmed by ViPTree analysis (Figure 3B).

3.2.5. Most of the Identified Phages Are Also Present in the Dairy Plant

In order to identify potential reservoirs of the five phages studied, the dairy plant—producing the cheese from which the phages were isolated—was investigated. The viral fractions resulting from each sample were first tested on five indicator strains with no enrichment step (each strain is sensitive to one of the five isolated phages described above) through a spot assay. If no plaques were observed, a second spot assay on the same strains was performed after enrichment (see Methods). The results are summarized in Figure 5.

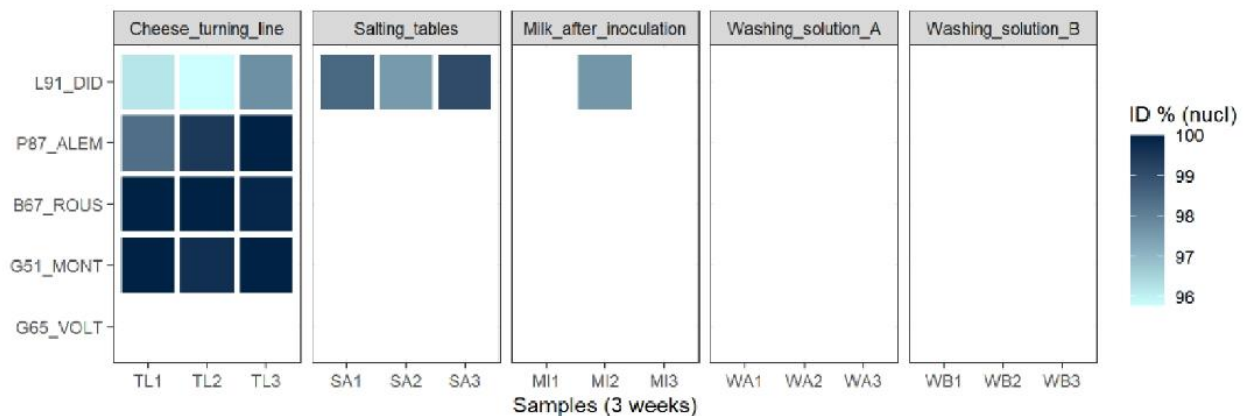


Figure 5. Sensitivity of indicator strains to phages present in different samples collected within the dairy plant.

Samples obtained from the two washing solutions did not produce lysis plaques using any of the tested strains. However, confluent lysis or clear lysis plaques were obtained using samples from milk, salting tables and the cheese turning line. More precisely, the cheese turning line represented the main reservoir for virulent phages infecting bacteria growing on the rind of this cheese. Indeed, confluent lysis spots were detected for four of the five recipient strains used in the assay (all but *G. arilaitensis* G65, the propagation strain of phage Voltaire) after infection with these samples. Furthermore, this result was observed three times at a one-week interval, revealing the persistence of the corresponding phages' species on the cheese turning line despite several cleaning cycles.

Salting tables represented a second, more restricted but persistent reservoir for dairy phages infecting *L. falkenbergense*. Lysis plaques (rather than confluent lysis zones) were repeatedly observed with *L. falkenbergense* 91 as the tested strain. This strain was also sensitive to phages coming from one of the three milk samples, indicating that inoculated milk can occasionally contain virulent phages.

Overall, the second spot assay (after enrichment) allowed for the observation of plaques for the same samples as the first one. In order to determine if the phages detected in the potential reservoirs through this experiment were indeed related to the ones previously isolated from the cheese surface, specific primers were designed for each phage (Table 2) and used to amplify and sequence the genetic material present in the different lysis zones or plaques. The sequences amplified from lysis zones detected using *G. arilaitensis* G51,

B. aurantiacum B67 and *P. aquimaris* 87 indicator strains presented high nucleotidic identity (from 98.4% to 100%) with phages Montesquieu, Rousseau and D'Alembert, respectively (Figure 5). This suggested that these phages, or their close relatives, were still present and infectious in the dairy plant one-and-a-half years after isolation from the cheese surface. Regarding the lysis plaques obtained with *L. falckenbergense* 91, a PCR product of the size expected for Diderot was also observed, but, depending on the sample, its sequence was not exactly identical to Diderot (ranging from 95.78 to 99.1%) (Figure 5). This may indicate that multiple phages capable of infecting this strain co-exist or evolve in the dairy plant.

4. Discussion

In this study, we first isolated and identified a collection of bacterial isolates from the rind of a French smear-ripened cheese to use it in a second phase for the isolation of phages from the same cheese. The biodiversity of the bacteria isolated during this research, comprising six main species, is typical of this kind of cheese. Indeed, the bacterial community of the surface of washed-rind cheeses generally comprises several distinct groups such as non-starter lactic acid bacteria (e.g., *Leuconostoc* spp.), staphylococci (e.g., *S. xylosum*, *S. equorum*), coryneform bacteria (e.g., *Glutamicibacter arilaitensis*, *Brevibacterium aurantiacum*, *Corynebacterium variabile*, *Microbacterium gubbeenense*) and Gram-negative bacteria (e.g., *Alcaligenes faecalis*, *Halomonas* spp., *Psychrobacter* spp., *Hafnia alvei*, *Proteus* spp., *Vibrio* spp., *Pseudoalteromonas* spp.) [24,58–60].

In contrast, only two isolates of *Brevibacterium aurantiacum*, which is generally added as a ripening culture in washed-rind cheeses produced worldwide [61], were obtained, indicating its low ability to outcompete the resident microbiota in this particular cheese. This trend was already observed for several commercial smear starter strains [62,63] and is widely discussed in the literature [64,65], although the reasons explaining their lack of fitness is not fully understood yet. One reason may be the presence of phages infecting such species in cheese. Indeed, one was successfully isolated in this study from a French smear-ripened cheese (*Brevibacterium* phage Rousseau), and a collection of sixteen phages (represented by *Brevibacterium* phage AGM1) was also recently isolated from similar Canadian products or their production environment [27].

Unlike *B. aurantiacum*, *Glutamicibacter arilaitensis* (formerly *Arthrobacter arilaitensis*) represented the most frequently isolated species in the bacterial collection established from the studied cheese. This yellow-pigmented bacteria is one of the major bacterial species found at the surface of smear-ripened cheeses [66,67]. It can be either deliberately inoculated as a ripening culture or naturally present in cheese, and previous work indicated the possible co-existence of multiple strains of *G. arilaitensis* in a single cheese product [62]. Interestingly, two genetically different phages (Voltaire and Montesquieu) with non-overlapping host ranges were isolated in this study from the same cheese rind. Whether the observed phage sensitivity could be related to the co-existence of distinct strains of *G. arilaitensis* within the studied cheese remains to be elucidated. Indeed, phages have already been identified as a key biotic factor favoring the maintenance of intra-species diversity in undefined starter cultures [68,69]. Another explanation would be that two populations of the same strain are present, differing only by their phage resistance profiles in terms of CRISPR diversity as suggested in [70].

Four out of the five newly described phages, namely *Glutamicibacter* phage Voltaire, *Glutamicibacter* phage Montesquieu, *Brevibacterium* phage Rousseau and *Psychrobacter* phage d'Alembert, shared only little sequence homology with previously sequenced phages. With the increasing number of phage genomes available, genome-based taxonomy is now used for phage classification. Specific requirements, including sequence identity thresholds for species and genus levels, have been proposed for rank-based demarcation of tailed phages [54]. Based on these criteria, the four above-mentioned phages would represent at least four new genera. This result illustrates the under-representation of phages infecting cheese-rind bacteria in public databases. Therefore, the cheese rind should be considered

as an attractive environment for the discovery of new phages with potential interest for the cheese industry and ferment producers.

AMGs were found in four of the five studied phages. These genes encode proteins similar to those used in the host metabolism and are supposed to boost metabolic steps that might be bottlenecks in the phage reproduction process [71]. They are mainly implied in the protein and nucleic acid metabolism. Among them, two were, to our knowledge, never described within phage genomes until now. Phage Rousseau ROUS_25 protein is a putative glutaminyl cyclase, named QC for short (HHpred likelihood probability 99.19% to PDB QC 3NOL). Glutaminyl cyclases are well characterized in eukaryotic organisms. This enzyme catalyzes the cyclization of N-terminal glutamine residues to the pyroglutamate of various proteins [72]. QC were more recently found as well in bacteria, and their function appears essential for *Porphyromonas gingivalis* growth [73,74]. The QC function in phage Rousseau remains to be established; it may help virion proteins to be more resistant against host proteolytic activity. Interestingly, a distant homolog of this protein is encoded in the genome of several *Brevibacterium* species (45% amino-acid identity). It is also similar to a *Brevibacterium iodinum* phage gene (Lucky Barnes, accession YP_009792202.1), which is annotated as “minor tail protein”. The second new AMG is present in *Glutamicibacter* phage Montesquieu, and encodes an aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD, MONT_41), just downstream from an ABC transporter. This cassette may contribute to improved amino-acid import and/or synthesis. One AMG present in the D’Alembert genome encoded a putative antitoxin (DAL_112) and might be considered as a host takeover function. Indeed, it is related to a *Staphylococcus aureus* antitoxin (HHpred likelihood probability 98.56% to PDB 6L8G), and antitoxins encoded by phages can protect themselves against host-produced toxins [75,76].

The host range of the five newly isolated phages is narrow and limited to a few sensitive isolates, which were exclusively obtained from the same tested cheese. All tested collection strains (not originating from that particular cheese), even the ones belonging to the same species as the indicator strain, were resistant. Similar results were reported for *Propionibacterium freudenreichii* phages isolated from Swiss hard cheese [18], and it is assumed that most phages possess a narrow host range [77]. Thus, with the aim of isolating bacteriophages from a given food sample, one should privilege building a specific collection of bacterial isolates from the same sample (sharing the same ecological niche), and, then, use it to search for phages through spot assays with or without enrichment. This approach may, however, favor the isolation of virulents at the expense of temperate phages due to superinfection immunity. Indeed, temperate phages originate from, or generate, bacterial lysogens, which, when isolated in the same environment and used as indicators, will prevent phage growth and plaque detection [78].

Looking for the origin of the isolated phages, we investigated five different types of samples collected in the cheesemaking plant producing the studied washed-rind cheese as potential reservoirs. Four phages (Rousseau, Montesquieu, Diderot and D’Alembert) were directly detected on the cheese turning line and one on the salting tables (Diderot). For Diderot, PCR-sequencing results revealed some nucleotide variance suggesting the co-occurrence of several closely related phages within the dairy plant, but further experiments are required to confirm this observation. The fact that the non-enriched viral fraction allows for the observation of plaques as well as enriched ones indicates that the level of contamination is non-negligible. Interestingly, in such samples, the positive detection of the different phages was observed three times at weekly intervals, indicating the persistence of these phages on working surfaces of the cheese plant despite regular cleaning procedures. Furthermore, the samples from the dairy plant were obtained almost 18 months after the isolation of phages from the cheese surface. This result indicates a long-term persistence of the four phages within the production environment and especially on manufacturing surfaces. On the other hand, milk after inoculation or the washing solutions should not be considered as major reservoirs since no targeted phages were repeatedly detected in such samples. Phage contamination in dairy plants has already been observed for a long time,

but most studies were focused on phages infecting LAB starters. According to the literature, the most probable sources of dairy phages are the starter cultures themselves, as some strains carry prophages that can evolve towards virulence later during the process [79], milk, whey, airborne particles and processing surfaces [15,19,80–82]. Previous studies conducted on cheesemaking facilities producing Gubbeen [83], or fresh, bloomy-rind and washed-rind cheeses [2], revealed that dominant bacterial and fungal taxa present on cheese, and mainly the non-inoculated ones, are also contaminating processing surfaces. Our study therefore suggests that the same applies for four bacteriophages infecting the rind bacteria.

5. Conclusions

Virulent bacteriophages infecting four of the main bacterial species living on the rind of a smear-ripened cheese were isolated and characterized. This provides the formal evidence that a diverse viral community co-occurs in this ecosystem along with the well-described bacterial and fungal communities, as previously suggested by viral metagenomics data. The low genomic relatedness of most of the newly isolated phages with currently known phages underlines the lack of knowledge regarding the viral fraction of the cheese ecosystem. Microbial communities of the cheese surface being largely involved in the typical sensory attributes and quality of the final products, further understanding about the role of such entities on cheese microbial ecology and finally their impact on cheese ripening would now be desirable.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v14081620/s1>, Table S1: Sensitive/resistant strains to Voltaire and Montesquieu; Table S2: AMGs encoded by each phage; Figure S1: Effect of temperature on infection efficiency.

Author Contributions: Conceptualization, T.P., M.-A.P. and E.D.-B.; Data curation, T.P.; Formal analysis, T.P., J.L., C.M. and O.R.; Funding acquisition, E.D.-B.; Investigation, T.P. and C.F.; Supervision, M.-A.P. and E.D.-B.; Visualization, T.P., J.L.; Writing—original draft preparation, T.P.; Writing—review and editing, J.L., M.-A.P. and E.D.-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: T.P. is the recipient of a doctoral fellowship from the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation (MESRI) and the MICA department of the French National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The genomic data for this study have been deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) at EMBL-EBI under accession number PRJEB48484. Assembled/annotated genome sequences of the five isolated phages were precisely deposited under the accession numbers OV696617 (Voltaire), OV696619 (Montesquieu), OV696620 (D’Alembert), OV696621 (Diderot) and OV696622 (Rousseau).

Acknowledgments: We thank Nicolas Ginet (CNRS, France) for sharing the protocol for the preparation of phages for the TEM observations, Christine Longin from the MIMA2 facilities (UMR 1313 GABI, INRAE) for the TEM observations, and our undergraduate students Thomas Clerc and Ines Pedros for testing the host range through spot assays.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Irlinger, F.; Layec, S.; Hélinck, S.; Dugat-Bony, E. Cheese Rind Microbial Communities: Diversity, Composition and Origin. *FEMS Microbiol. Lett.* **2015**, *362*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bokulich, N.A.; Mills, D.A. Facility-Specific “House” Microbiome Drives Microbial Landscapes of Artisan Cheesemaking Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 5214–5223. [[CrossRef](#)]
- Montel, M.-C.; Buchin, S.; Mallet, A.; Delbes-Paus, C.; Vuitton, D.A.; Desmasures, N.; Berthier, F. Traditional Cheeses: Rich and Diverse Microbiota with Associated Benefits. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *177*, 136–154. [[CrossRef](#)]
- Penland, M.; Falentin, H.; Parayre, S.; Pawtowski, A.; Maillard, M.-B.; Thierry, A.; Mounier, J.; Coton, M.; Deutsch, S.-M. Linking Pélarçon Artisanal Goat Cheese Microbial Communities to Aroma Compounds during Cheese-Making and Ripening. *Int. J. Food Microbiol.* **2021**, *345*, 109130. [[CrossRef](#)]
- Panthi, R.R.; Jordan, K.N.; Kelly, A.L.; Sheehan, J.J. Selection and Treatment of Milk for Cheesemaking. In *Cheese*, 4th ed.; McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2017; Chapter 2; pp. 23–50. ISBN 978-0-12-417012-4.
- Parente, E.; Cogan, T.M.; Powell, I.B. Starter Cultures: General Aspects. In *Cheese*, 4th ed.; McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2017; Chapter 8; pp. 201–226. ISBN 978-0-12-417012-4.
- Helinck, S.; Le Bars, D.; Moreau, D.; Yvon, M. Ability of Thermophilic Lactic Acid Bacteria to Produce Aroma Compounds from Amino Acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 3855–3861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Leistner, L.; Gorris, L.G.M. Food Preservation by Hurdle Technology. *Trends Food Sci. Technol.* **1995**, *6*, 41–46. [[CrossRef](#)]
- Brum, J.R.; Ignacio-Espinoza, J.C.; Roux, S.; Doucier, G.; Acinas, S.G.; Alberti, A.; Chaffron, S.; Cruaud, C.; de Vargas, C.; Gasol, J.M.; et al. Patterns and Ecological Drivers of Ocean Viral Communities. *Science* **2015**, *348*, 1261498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Shapiro, O.H.; Kushmaro, A.; Brenner, A. Bacteriophage Predation Regulates Microbial Abundance and Diversity in a Full-Scale Bioreactor Treating Industrial Wastewater. *ISME J.* **2010**, *4*, 327–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sutton, T.D.S.; Hill, C. Gut Bacteriophage: Current Understanding and Challenges. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Paillet, T.; Dugat-Bony, E. Bacteriophage Ecology of Fermented Foods: Anything New under the Sun? *Curr. Opin. Food Sci.* **2021**, *40*, 102–111. [[CrossRef](#)]
- Brüssow, H. Phages of Dairy Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **2001**, *55*, 283–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Brüssow, H.; Kutter, E. Phage Ecology. In *Bacteriophages*; Kutter, E., Sulakvelidze, A., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2004; ISBN 978-0-8493-1336-3.
- Garneau, J.E.; Moineau, S. Bacteriophages of Lactic Acid Bacteria and Their Impact on Milk Fermentations. *Microb. Cell Fact* **2011**, *10*, S20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Marcó, M.B.; Moineau, S.; Quiberoni, A. Bacteriophages and Dairy Fermentations. *Bacteriophage* **2012**, *2*, 149–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Brüssow, H.; Fremont, M.; Bruttin, A.; Sidoti, J.; Constable, A.; Fryder, V. Detection and Classification of *Streptococcus Thermophilus* Bacteriophages Isolated from Industrial Milk Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 4537–4543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gautier, M.; Rouault, A.; Sommer, P.; Briandet, R. Occurrence of *Propionibacterium Freudenreichii* Bacteriophages in Swiss Cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 2572–2576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Madera, C.; Monjardín, C.; Suárez, J.E. Milk Contamination and Resistance to Processing Conditions Determine the Fate of *Lactococcus Lactis* Bacteriophages in Dairies. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 7365–7371. [[CrossRef](#)]
- Wagner, N.; Brinks, E.; Samtlebe, M.; Hinrichs, J.; Atamer, Z.; Kot, W.; Franz, C.M.A.P.; Neve, H.; Heller, K.J. Whey Powders Are a Rich Source and Excellent Storage Matrix for Dairy Bacteriophages. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *241*, 308–317. [[CrossRef](#)]
- Bockelmann, W. Cheese | Smear-Ripened Cheeses. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd ed.; Fuquay, J.W., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2011; pp. 753–766. ISBN 978-0-12-374407-4.
- Mounier, J.; Coton, M.; Irlinger, F.; Landaud, S.; Bonnarne, P. Smear-Ripened Cheeses. In *Cheese*, 4th ed.; McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2017; Chapter 38; pp. 955–996. ISBN 978-0-12-417012-4.
- Dugat-Bony, E.; GARNIER, L.; Denonfoux, J.; Ferreira, S.; Sarthou, A.-S.; Bonnarne, P.; Irlinger, F. Highlighting the Microbial Diversity of 12 French Cheese Varieties. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *238*, 265–273. [[CrossRef](#)]
- Irlinger, F.; Monnet, C. Temporal Differences in Microbial Composition of Époisses Cheese Rinds during Ripening and Storage. *J. Dairy Sci.* **2021**, *104*, 7500–7508. [[CrossRef](#)]
- Mounier, J.; Gelsomino, R.; Goerges, S.; Vancanneyt, M.; Vandemeulebroecke, K.; Hoste, B.; Scherer, S.; Swings, J.; Fitzgerald, G.F.; Cogan, T.M. Surface Microflora of Four Smear-Ripened Cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 6489–6500. [[CrossRef](#)]
- Dugat-Bony, E.; Lossouarn, J.; De Paepe, M.; Sarthou, A.-S.; Fedala, Y.; Petit, M.-A.; Chaillou, S. Viral Metagenomic Analysis of the Cheese Surface: A Comparative Study of Rapid Procedures for Extracting Viral Particles. *Food Microbiol.* **2020**, *85*, 103278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- De Melo, A.G.; Rousseau, G.M.; Tremblay, D.M.; Labrie, S.J.; Moineau, S. DNA Tandem Repeats Contribute to the Genetic Diversity of *Brevibacterium Aurantiacum* Phages. *Environ. Microbiol.* **2020**, *22*, 3413–3428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Edwards, U.; Rogall, T.; Blöcker, H.; Emde, M.; Böttger, E.C. Isolation and Direct Complete Nucleotide Determination of Entire Genes. Characterization of a Gene Coding for 16S Ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 7843–7853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

29. Yoon, S.-H.; Ha, S.-M.; Kwon, S.; Lim, J.; Kim, Y.; Seo, H.; Chun, J. Introducing EzBioCloud: A Taxonomically United Database of 16S rRNA Gene Sequences and Whole-Genome Assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2017**, *67*, 1613–1617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Jurczak-Kurek, A.; Gasiór, T.; Nejman-Faleńczyk, B.; Bloch, S.; Dydecka, A.; Topka, G.; Necel, A.; Jakubowska-Deredas, M.; Narajczyk, M.; Richert, M.; et al. Biodiversity of Bacteriophages: Morphological and Biological Properties of a Large Group of Phages Isolated from Urban Sewage. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34338. [[CrossRef](#)]
31. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675. [[CrossRef](#)]
32. Jakočiūnė, D.; Moodley, A. A Rapid Bacteriophage DNA Extraction Method. *Methods Protoc.* **2018**, *1*, 27. [[CrossRef](#)]
33. Ewels, P.; Magnusson, M.; Lundin, S.; Käller, M. MultiQC: Summarize Analysis Results for Multiple Tools and Samples in a Single Report. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 3047–3048. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Lanfear, R.; Schalamun, M.; Kainer, D.; Wang, W.; Schwesinger, B. MinIONQC: Fast and Simple Quality Control for MinION Sequencing Data. *Bioinformatics* **2019**, *35*, 523–525. [[CrossRef](#)]
35. Wick, R.R.; Judd, L.M.; Gorrie, C.L.; Holt, K.E. Completing Bacterial Genome Assemblies with Multiplex MinION Sequencing. *Microb. Genom.* **2017**, *3*, e000132. [[CrossRef](#)]
36. Wick, R.R.; Judd, L.M.; Cerdeira, L.T.; Hawkey, J.; Méric, G.; Vezina, B.; Wyres, K.L.; Holt, K.E. Tricycler: Consensus Long-Read Assemblies for Bacterial Genomes. *Genome Biol.* **2021**, *22*, 266. [[CrossRef](#)]
37. Wick, R.R.; Judd, L.M.; Gorrie, C.L.; Holt, K.E. Unicycler: Resolving Bacterial Genome Assemblies from Short and Long Sequencing Reads. *PLoS Comput. Biol.* **2017**, *13*, e1005595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Kolmogorov, M.; Yuan, J.; Lin, Y.; Pevzner, P.A. Assembly of Long, Error-Prone Reads Using Repeat Graphs. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 540–546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Vaser, R.; Šikić, M. Time- and Memory-Efficient Genome Assembly with Raven. *Nat. Comput. Sci.* **2021**, *1*, 332–336. [[CrossRef](#)]
40. Walker, B.J.; Abeel, T.; Shea, T.; Priest, M.; Abouelliel, A.; Sakthikumar, S.; Cuomo, C.A.; Zeng, Q.; Wortman, J.; Young, S.K.; et al. Pilon: An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e112963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114–2120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Mikheenko, A.; Prjibelski, A.; Saveliev, V.; Antipov, D.; Gurevich, A. Versatile Genome Assembly Evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics* **2018**, *34*, i142–i150. [[CrossRef](#)]
43. Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Prjibelski, A.D.; et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.* **2012**, *19*, 455–477. [[CrossRef](#)]
44. Garneau, J.R.; Depardieu, F.; Fortier, L.-C.; Bikard, D.; Monot, M. PhageTerm: A Tool for Fast and Accurate Determination of Phage Termini and Packaging Mechanism Using next-Generation Sequencing Data. *Sci Rep* **2017**, *7*, 8292. [[CrossRef](#)]
45. Aziz, R.K.; Bartels, D.; Best, A.A.; DeJongh, M.; Disz, T.; Edwards, R.A.; Formsma, K.; Gerdes, S.; Glass, E.M.; Kubal, M.; et al. The RAST Server: Rapid Annotations Using Subsystems Technology. *BMC Genom.* **2008**, *9*, 75. [[CrossRef](#)]
46. Zimmermann, L.; Stephens, A.; Nam, S.-Z.; Rau, D.; Kübler, J.; Lozajic, M.; Gabler, F.; Söding, J.; Lupas, A.N.; Alva, V. A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at Its Core. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 2237–2243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [[CrossRef](#)]
48. Lu, S.; Wang, J.; Chitsaz, F.; Derbyshire, M.K.; Geer, R.C.; Gonzales, N.R.; Gwadz, M.; Hurwitz, D.I.; Marchler, G.H.; Song, J.S.; et al. CDD/SPARCLE: The Conserved Domain Database in 2020. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D265–D268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Marchler-Bauer, A.; Bryant, S.H. CD-Search: Protein Domain Annotations on the Fly. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W327–W331. [[CrossRef](#)]
50. Terzian, P.; Olo Ndela, E.; Galiez, C.; Lossouarn, J.; Pérez Bucio, R.E.; Mom, R.; Toussaint, A.; Petit, M.-A.; Enault, F. PHROG: Families of Prokaryotic Virus Proteins Clustered Using Remote Homology. *NAR Genom. Bioinform.* **2021**, *3*, lqab067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Lopes, A.; Tavares, P.; Petit, M.-A.; Guérois, R.; Zinn-Justin, S. Automated Classification of Tailed Bacteriophages According to Their Neck Organization. *BMC Genom.* **2014**, *15*, 1027. [[CrossRef](#)]
52. Chen, L.; Yang, J.; Yu, J.; Yao, Z.; Sun, L.; Shen, Y.; Jin, Q. VFDB: A Reference Database for Bacterial Virulence Factors. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, D325–D328. [[CrossRef](#)]
53. Florensa, A.F.; Kaas, R.S.; Clausen, P.T.L.C.; Aytan-Aktug, D.; Aarestrup, F.M.Y. ResFinder—An Open Online Resource for Identification of Antimicrobial Resistance Genes in next-Generation Sequencing Data and Prediction of Phenotypes from Genotypes. *Microb. Genom.* **2022**, *8*, 000748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Turner, D.; Kropinski, A.M.; Adriaenssens, E.M. A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses* **2021**, *13*, 506. [[CrossRef](#)]
55. Nishimura, Y.; Yoshida, T.; Kuronishi, M.; Uehara, H.; Ogata, H.; Goto, S. ViPTree: The Viral Proteomic Tree Server. *Bioinformatics* **2017**, *33*, 2379–2380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Sullivan, M.B.; Weitz, J.S.; Wilhelm, S. Viral Ecology Comes of Age. *Environ. Microbiol. Rep.* **2017**, *9*, 33–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

57. Xie, Y.; Wahab, L.; Gill, J.J. Development and Validation of a Microtiter Plate-Based Assay for Determination of Bacteriophage Host Range and Virulence. *Viruses* **2018**, *10*, 189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Cogan, T.M.; Chamba, J.-F.; Hohenegger, M.; Guéguen, M.; Ward, A.C.; Gelsomino, R.; Jamet, E.; Swings, J.; Irlinger, F.; Larpin, S.; et al. Biodiversity of the Surface Microbial Consortia from Limburger, Reblochon, Livarot, Tilsit, and Gubbeen Cheeses. In *Cheese and Microbes*; Donnelly, C.W., Ed.; American Society of Microbiology: Washington, DC, USA, 2014; pp. 219–250. ISBN 978-1-55581-586-8.
59. Larpin-Laborde, S.; Imran, M.; Bonaïti, C.; Bora, N.; Gelsomino, R.; Goerges, S.; Irlinger, F.; Goodfellow, M.; Ward, A.C.; Vancanneyt, M.; et al. Surface Microbial Consortia from Livarot, a French Smear-Ripened Cheese. *Can. J. Microbiol.* **2011**, *57*, 651–660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Quigley, L.; O’Sullivan, O.; Beresford, T.P.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Cotter, P.D. High-Throughput Sequencing for Detection of Subpopulations of Bacteria Not Previously Associated with Artisanal Cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 5717–5723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Irlinger, F.; Helinck, S.; Jany, J.L. Secondary and Adjunct Cultures. In *Cheese*, 4th ed.; McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2017; Chapter 11; pp. 273–300. ISBN 978-0-12-417012-4.
62. Feurer, C.; Vallaëys, T.; Corrieu, G.; Irlinger, F. Does Smearing Inoculum Reflect the Bacterial Composition of the Smear at the End of the Ripening of a French Soft, Red-Smear Cheese? *J. Dairy Sci.* **2004**, *87*, 3189–3197. [[CrossRef](#)]
63. Goerges, S.; Mounier, J.; Rea, M.C.; Gelsomino, R.; Heise, V.; Beduhn, R.; Cogan, T.M.; Vancanneyt, M.; Scherer, S. 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.* **2008**, *74*, 2210–2217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Bertuzzi, A.S.; Walsh, A.M.; Sheehan, J.J.; Cotter, P.D.; Crispie, F.; McSweeney, P.L.H.; Kilcawley, K.N.; Rea, M.C. Omics-Based Insights into Flavor Development and Microbial Succession within Surface-Ripened Cheese. *mSystems* **2018**, *3*, e00211-17. [[CrossRef](#)]
65. Pham, N.-P.; Layec, S.; Dugat-Bony, E.; Vidal, M.; Irlinger, F.; Monnet, C. Comparative Genomic Analysis of *Brevibacterium* Strains: Insights into Key Genetic Determinants Involved in Adaptation to the Cheese Habitat. *BMC Genom.* **2017**, *18*, 955. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Irlinger, F.; Bimet, F.; Delettre, J.; Lefèvre, M.; Grimont, P.A.D.Y. *Arthrobacter Bergerei* Sp. Nov. and *Arthrobacter Arilaitensis* Sp. Nov., Novel Coryneform Species Isolated from the Surfaces of Cheeses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2005**, *55*, 457–462. [[CrossRef](#)]
67. Monnet, C.; Loux, V.; Gibrat, J.-F.; Spinnler, E.; Barbe, V.; Vacherie, B.; Gavory, F.; Gourbeyre, E.; Siguier, P.; Chandler, M.; et al. The *Arthrobacter Arilaitensis* Re117 Genome Sequence Reveals Its Genetic Adaptation to the Surface of Cheese. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e15489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Erkus, O.; de Jager, V.C.; Spus, M.; van Alen-Boerrigter, I.J.; van Rijswijk, I.M.; Hazelwood, L.; Janssen, P.W.; van Hijum, S.A.; Kleerebezem, M.; Smid, E.J. Multifactorial Diversity Sustains Microbial Community Stability. *ISME J.* **2013**, *7*, 2126–2136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Spus, M.; Li, M.; Alexeeva, S.; Wolkers-Rooijackers, J.C.M.; Zwietering, M.H.; Abee, T.; Smid, E.J. Strain Diversity and Phage Resistance in Complex Dairy Starter Cultures. *J. Dairy Sci.* **2015**, *98*, 5173–5182. [[CrossRef](#)]
70. Somerville, V.; Berthoud, H.; Schmidt, R.S.; Bachmann, H.-P.; Meng, Y.H.; Fuchsmann, P.; von Ah, U.; Engel, P. Functional Strain Redundancy and Persistent Phage Infection in Swiss Hard Cheese Starter Cultures. *ISME J.* **2022**, *16*, 388–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Thompson, L.R.; Zeng, Q.; Kelly, L.; Huang, K.H.; Singer, A.U.; Stubbe, J.; Chisholm, S.W. Phage Auxiliary Metabolic Genes and the Redirection of Cyanobacterial Host Carbon Metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, E757–E764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Booth, R.E.; Lovell, S.C.; Misquitta, S.A.; Bateman, R.C. Human Glutaminy Cyclase and Bacterial Zinc Aminopeptidase Share a Common Fold and Active Site. *BMC Biol.* **2004**, *2*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Taudte, N.; Linnert, M.; Rahfeld, J.-U.; Piechotta, A.; Ramsbeck, D.; Buchholz, M.; Kolenko, P.; Parthier, C.; Houston, J.A.; Veillard, F.; et al. Mammalian-like Type II Glutaminy Cyclases in *Porphyromonas Gingivalis* and Other Oral Pathogenic Bacteria as Targets for Treatment of Periodontitis. *J. Biol. Chem.* **2021**, *296*, 100263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Lamers, S.; Feng, Q.; Cheng, Y.; Yu, S.; Sun, B.; Lukman, M.; Jiang, J.; Ruiz-Carrillo, D. Structural and Kinetic Characterization of *Porphyromonas Gingivalis* Glutaminy Cyclase. *Biol. Chem.* **2021**, *402*, 759–768. [[CrossRef](#)]
75. Blower, T.R.; Evans, T.J.; Przybilski, R.; Fineran, P.C.; Salmond, G.P.C. Viral Evasion of a Bacterial Suicide System by RNA-Based Molecular Mimicry Enables Infectious Altruism. *PLoS Genet.* **2012**, *8*, e1003023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Otsuka, Y.; Yonesaki, T. Dmd of Bacteriophage T4 Functions as an Antitoxin against *Escherichia Coli* LsoA and RnIA Toxins. *Mol. Microbiol.* **2012**, *83*, 669–681. [[CrossRef](#)]
77. Weinbauer, M.G. Ecology of Prokaryotic Viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* **2004**, *28*, 127–181. [[CrossRef](#)]
78. Abedon, S.T. Prophages Preventing Phage Superinfection. In *Bacteriophages as Drivers of Evolution: An Evolutionary Ecological Perspective*; Abedon, S.T., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2022; pp. 179–191. ISBN 978-3-030-94309-7.
79. Chopin, A.; Bolotin, A.; Sorokin, A.; Ehrlich, S.D.; Chopin, M.-C. Analysis of Six Prophages in *Lactococcus Lactis* IL1403: Different Genetic Structure of Temperate and Virulent Phage Populations. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 644–651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

80. Murphy, J.; Mahony, J.; Fitzgerald, G.F.; van Sinderen, D. Bacteriophages Infecting Lactic Acid Bacteria. In *Cheese*, 4th ed.; McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2017; Chapter 10; pp. 249–272. ISBN 978-0-12-417012-4.
81. Neve, H.; Kemper, U.; Geis, A.; Heller, K.J. Monitoring and characterization of lactococcal bacteriophages in a dairy plant. *Kiel. Milchwirtsch. Forsch.* **1994**, *46*, 167–178.
82. Verreault, D.; Gendron, L.; Rousseau, G.M.; Veillette, M.; Massé, D.; Lindsley, W.G.; Moineau, S.; Duchaine, C. Detection of Airborne Lactococcal Bacteriophages in Cheese Manufacturing Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 491–497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Mounier, J.; Goerges, S.; Gelsomino, R.; Vancanneyt, M.; Vandemeulebroecke, K.; Hoste, B.; Brennan, N.M.; Scherer, S.; Swings, J.; Fitzgerald, G.F.; et al. Sources of the Adventitious Microflora of a Smear-Ripened Cheese. *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *101*, 668–681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

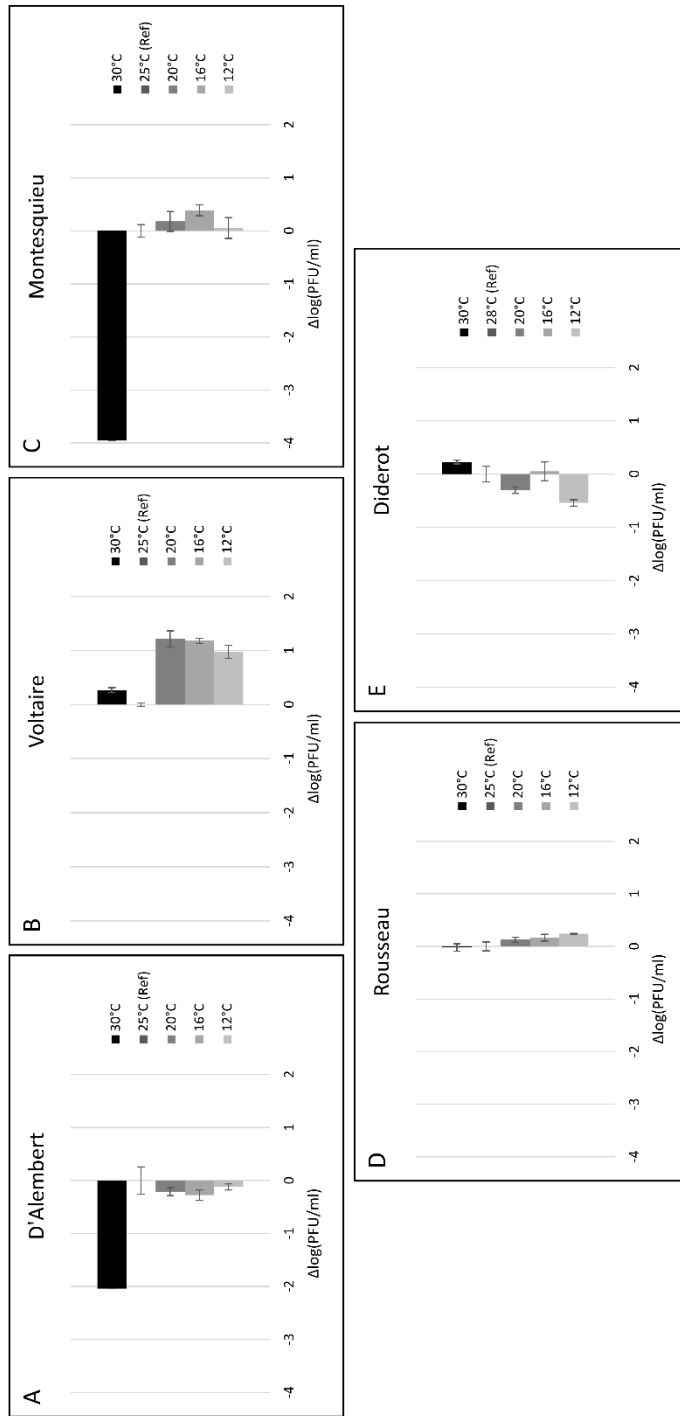


Figure S1. Effect of temperature on infection efficiency. (A) *Psychrobacter* phage D'Alembert, (B) *Glutamicibacter* phage Voltaire, (C) *Glutamicibacter* phage Montesquieu, (D) *Brevibacterium* phage Rousseau and (E) *Leuconostoc* phage Diderot. The data represent the difference between phage titer (log PFU/ml) obtained at a given temperature and phage titer obtained at the temperature used for phage isolation (Ref). Error bars indicate the standard deviation from three independent measures of the titer.

Supplementary Table 1. Sensitive/resistant strains to Voltaire and Montesquieu

Strain or isolate	Source	Sensitivity to Voltaire	Sensitivity to Montesquieu
16	Studied cheese	-	-
26	Studied cheese	-	+
33	Studied cheese	-	+
43	Studied cheese	-	-
51	Studied cheese	-	+
52	Studied cheese	-	+
53	Studied cheese	-	+
65	Studied cheese	+	-
119	Studied cheese	+	-
135	Studied cheese	-	-
183	Studied cheese	-	-
186	Studied cheese	-	+
201	Studied cheese	-	+
<i>G. arilaitensis</i> Re117 (DSM 16368)	Reblochon cheese	-	-
<i>G. bergerei</i> Ca106 (DSM 16367)	Camembert cheese	-	-
<i>G. nicotianae</i> DSM 20123	Air of tobacco warehouses	-	-
<i>G. uratoxydans</i> DSM 20647	Humus soil	-	-

Supplementary Table 2. AMGs encoded by each phage

Phage	Number of CDS	CDS	Function
Voltaire	0	/	/
Montesquieu	2	MONT_40	ABC (ATP-Binding Cassette) transporter
		MONT_41	ACCD (Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase)
Rousseau	3	ROUS_25	Putative glutaminyl cyclase
		ROUS_48	Thioredoxin-like protein
		ROUS_51	S-adenosyl-dependent methyltransferase
Diderot	1	DID_9	Ribonuclease Z
		DAL_34	Thioredoxin
		DAL_47	Putative antitoxin
		DAL_102	Transglycosylase
D'Alembert	7	DAL_103	Chaperonin
		DAL_106	S-adenosyl-dependent methyltransferase
		DAL_114	Ntn_hydrolase-like protein
		DAL_134	Nucleoside Triphosphate Pyrophosphohydrolase

Discussion

Ce travail a permis de montrer que des phages virulents capables d'infecter des bactéries typiques de la surface du fromage co-existent avec leurs hôtes dans cet écosystème. Sans surprise, la plupart des phages isolés sont éloignés d'un point de vue génomique des phages déjà répertoriés dans les bases de données. Ce résultat était attendu puisque très peu d'études se sont attachées, comme ici, à isoler et caractériser des phages infectant des bactéries du fromage autres que des ferments lactiques (Gautier et al. 1995a; de Melo et al. 2020).

Leur caractérisation ouvre des pistes de recherche intéressantes quant à leur place dans l'écosystème fromager. Leurs spectres d'hôtes sont réduits, ce qui suggère une interaction limitée à une ou quelques souches au sein de chaque espèce bactérienne. Une étude préalable sur un ferment lactique indéfini, a montré que la diminution drastique de l'abondance d'une souche particulière liée à la prédation par un phage n'a pas forcément d'impact sur l'abondance de l'espèce à laquelle elle appartient si plusieurs souches de la même espèce sont présentes dans l'écosystème. La présence de phages peut dans ce cas favoriser le maintien d'une certaine diversité génétique au sein des espèces bactériennes de l'écosystème (Erkus et al. 2013).

Enfin, la détection de phages dans l'usine, sans enrichissement préalable, démontre une colonisation efficace de l'environnement de production, des équipements jusqu'au produit fini. Les phages feraient donc a priori partie du « microbiote maison » (Bokulich et Mills 2013), qui enrichit en microorganismes indigènes l'écosystème fromager au cours du procédé de fabrication.

La collection de phages et de souches bactériennes sensibles constituée lors de ce travail pourra à l'avenir être exploitée pour étudier plus précisément le rôle écologique de ces phages dans l'écosystème microbien du fromage. Elle pourra également être utilisée pour tester la sensibilité de souches d'intérêt aux phages pour une application en fromagerie.

Bien que les résultats obtenus lors de ce travail démontrent que des phages virulents sont bel et bien présents en surface du fromage, ils ne permettent pas d'évaluer leur impact sur l'équilibre des populations microbiennes et, de manière générale, sur la fermentation. Pour avancer dans cette direction, d'autres expérimentations, comme des suivis dynamiques de la

communauté virale au cours d'un cycle de production, ou des données sur la persistance des différentes populations de phages sur le long terme, sont nécessaires.

CHAPITRE 3

Etude de la dynamique des bactériophages de la surface d'un fromage à pâte molle et croûte lavée durant le procédé d'affinage et de la stabilité du virome sur le long terme

Avant-propos

Le précédent chapitre décrit l'isolement de cinq phages à partir de la surface d'un fromage à pâte molle et croûte lavée et la détection de quatre d'entre eux dans l'environnement de fabrication. Leur caractérisation fournit de premiers indices sur leur potentiel rôle dans l'écosystème fromager. Cependant, ces résultats n'offrent qu'une vision incomplète de la communauté virale présente dans cet écosystème.

La métagénomique virale représente une approche de choix pour décrire de manière exhaustive la composition des écosystèmes microbiens en bactériophages (Hayes et al. 2017). C'est pourquoi elle a été mise en œuvre pour poursuivre l'exploration du fromage PCML étudié. Elle a été utilisée pour suivre les métaviromes de fromages en cours d'affinage, dans le but de savoir si les communautés virales sont dynamiques durant le processus de fermentation, à l'instar des autres microorganismes de l'écosystème. En parallèle, des métaviromes de fromages affinés produits à plusieurs années d'intervalle ont été analysés, afin de déterminer si les principales populations phagiques persistent sur le long terme. Dans les deux cas, les séquences des cinq phages isolés précédemment ont été recherchées dans les métaviromes afin de mieux apprécier leur importance dans la communauté par rapport aux autres phages détectés. Bien que la métagnomique virale ne soit pas une approche quantitative, une abondance relative de séquences importante pourrait en effet suggérer une forte prédation de leurs hôtes et donc un impact potentiellement conséquent sur leur développement dans l'écosystème.

Démarche

Dans le but d'évaluer l'impact des phages sur la dynamique microbienne des fromages, la composition de la communauté virale de la surface d'un fromage de type PMCL a été suivie au cours de la période d'affinage par une approche de métagénomique virale. Des métaviromes ont été produits à partir d'échantillons de fromages correspondants à cinq points de prélèvements (en triplicats) en suivant le protocole précédemment mis au point au laboratoire (Dugat-Bony et al. 2020). Ces prélèvements ont été réalisés sur un même batch de production de manière à couvrir la période d'affinage et ont été réalisés systématiquement après l'application d'un soin de croûte. En parallèle, la composition de la communauté bactérienne a

été suivie sur les mêmes échantillons par une approche de métagénomique ciblée (régions V3-V4 du gène codant pour l'ARNr 16S).

La même démarche a été appliquée sur des fromages affinés de la même variété mais produits à plusieurs années d'intervalle pour évaluer la persistance de la communauté virale sur le long terme. Ainsi, des métaviromes de la surface de trois fromages PMCL achetés dans le commerce (donc après la fin de la période d'affinage) ont été réalisés en 2017, 2019 et 2022, couvrant ainsi une période d'environ cinq ans.

Ce chapitre est présenté sous la forme d'une ébauche d'article de recherche.

Principaux résultats

L'assemblage des séquences provenant de l'ensemble des échantillons analysés (15 pour l'étude dynamique et 9 pour l'étude sur la persistance) a conduit à la production d'un métavirome composé de 4222 contigs de plus de 2 kb considérés comme d'origine virale suite aux résultats de prédiction obtenus par les outils bioinformatiques VIBRANT (Kieft et al. 2020) et VirSorter2 (Guo et al. 2021).

L'analyse des métaviromes montre tout d'abord qu'une partie de la communauté virale varie au cours de l'affinage. Une transition majeure a notamment pu être mise en évidence entre les soins n° 2 et 3. Un ensemble de contigs qui sont peu présents voire non détectés en début d'affinage, deviennent alors très abondants (en abondance relative). Au contraire, un autre groupe de contigs qui sont abondants, voire très abondants en début d'affinage, deviennent plus rares en fin d'affinage. L'analyse différentielle réalisée montre que les contigs dont l'abondance relative est significativement plus élevée en début d'affinage correspondent principalement à des phages de ferments lactiques (comme *Lactococcus lactis* et *Streptococcus thermophilus*). Au contraire, les contigs statistiquement plus abondants en fin d'affinage possèdent une homologie de séquence avec des génomes de phage capables d'infecter des bactéries plutôt caractéristiques de la surface de fromages affinés comme *Glutamicibacter*, *Brevibacterium*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Proteus*, *Arthrobacter* ou *Leuconostoc*. Parmi eux figurent des contigs très proches des génomes des phages Montesquieu, Diderot et Rousseau isolés dans le cadre des travaux présentés dans le chapitre précédent.

La transition observée sur la composition de la communauté virale concorde avec celle de la communauté bactérienne. En effet, après le deuxième lavage l'abondance relative de *Lactococcus* (le genre dominant jusqu'alors) diminue pour laisser la place à d'autres bactéries plus typiques de la surface des fromages affinés comme des *Psychrobacter*, *Vibrio*, *Glutamicibacter* et *Pseudoalteromonas*.

Concernant l'analyse des métaviromes de fromages prélevés au cours de différentes années de production, les résultats indiquent que la composition de la communauté virale de la surface du fromage étudiée est plutôt stable sur le long terme. En effet, si les analyses de diversité bêta (basées sur le calcul d'indices de dissimilarité de Bray-Curtis) révèlent que des différences significatives de structure des viromes sont observées entre années de production, les données montrent que 88% des 299 contigs dont l'abondance relative normalisée est en moyenne supérieure à 0,01% sont détectés quelque soit l'année de production. Ce chiffre grimpe même à 92,6% en considérant les contigs détectés dans des échantillons de deux années de production différentes. Les différences de structure de communautés entre années de production peuvent alors être expliquées par la présence spécifique de contigs faiblement abondants dans certains échantillons plutôt que d'autres et/ou par des différences d'abondances relatives de contigs partagés.

Dynamic of the viral community of the cheese surface during the ripening process and persistence across production years

Thomas Paillet¹, Clarisse Figueroa¹, Julien Lossouarn², Marie-Agnès Petit², Eric Dugat-Bony¹

¹Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR SayFood, 91120 Palaiseau, France

²Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78352 Jouy-en-Josas, France

Abstract

The surface of smear-ripened cheeses represents a complex microbial ecosystem resulting from the successive development of different microbial groups. Recent studies indicate that a viral community, mainly composed of bacteriophages, coexists with cellular microorganisms in this ecosystem, but its ecological significance remains to be elucidated. In this work, we studied a French smear-ripened cheese by applying a viral metagenomics approach to assess both the dynamics of the phage community on the cheese surface during the ripening period, and the persistence of phages in ripened cheeses over the years of production. We observed a strong transition of the phage community structure during ripening with a decreased relative abundance of contigs associated with *Lactococcus* phages, which were replaced by contigs associated with phages infecting non-starter lactic acid bacteria and ripening bacteria such as *Leuconostoc*, *Brevibacterium*, *Glutamicibacter*, *Aeromonas*, *Pseudoalteromonas* and *Vibrio*. The dynamic of the phage community was strongly associated with bacterial successions observed on the cheese surface. Finally, the most abundant contigs of the metavirome were systematically detected in ready-to-consume cheeses produced at different dates spanning more than 4 years of production, indicating long-term persistence of the main phages in the cheese production environment. Together, these results provide new insights into the ecology of bacteriophages in smear-ripened cheese and highlight the importance of considering bacteriophages in the study of the microbial ecology of cheese.

Introduction

Due to their unique ripening process, involving frequent washes with saline and/or alcoholic solutions, smear-ripened cheeses host a peculiar and diverse microbiota composed of lactic acid bacteria (LAB, mainly starters), yeasts and salt-tolerant bacteria belonging to the *Actinobacteria*, *Bacillota* and *Pseudomonadota* phyla (Mounier et al., 2017). The surface microbiota of smear-ripened cheeses is considered to be responsible for the typical flavour and organoleptic properties of this type of cheese (Corsetti et al., 2001). From the past two decades, numerous studies have been conducted to describe the composition of this microbiota using isolation-based methods (Larpin-Laborde et al., 2011; Lavoie et al., 2012), molecular fingerprinting (Feurer et al., 2004; Mounier et al., 2009, 2005; Rea et al., 2007), and more recently amplicon-based metagenomics also commonly referred to as metabarcoding (Delcenserie et al., 2014; Dugat-Bony et al., 2016; Quigley et al., 2012; Wolfe et al., 2014).

Dynamic studies also enabled to reveal microbial successions occurring on the surface of smear-ripened cheeses (Irlinger and Monnet, 2021; Rea et al., 2007). Lactic acid bacteria (LAB), usually from starter cultures, grow first in the milk and represent the dominant microorganisms in the curd. Yeasts such as *Debaryomyces hansenii* and *Geotrichum candidum*, which are acid tolerant, then colonise the cheese surface leading to deacidification by the consumption of lactate and the production of ammonia. With the pH increase, the establishment of a diverse bacterial community is progressively observed. The most common bacterial taxa detected at the end of ripening on smear-ripened cheese belong to coryneform bacteria (e.g. species of the *Glutamicibacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* or *Brachybacterium* genera), *Staphylococcus* species and halophilic or halotolerant gram-negative bacteria (e.g. species of the *Psychrobacter*, *Halomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Hafnia*, *Vibrio*, *Pseudomonas* or *Proteus* genera) (Kothe et al., 2021).

Microbial interactions are key biotic factors determining the structure and function of cheese microbial ecosystems and, ultimately, affecting cheese quality and safety (Irlinger and Mounier, 2009; Mayo et al., 2021). In many natural ecosystems, bacteriophage predation is a well-known example of interaction shaping the composition of bacterial populations (Brown et al., 2022) and recent work suggests the same apply to fermented foods (as reviewed in (Ledormand et

al., 2020; Paillet and Dugat-Bony, 2021)). In the dairy industry, the impact of LAB phages is well documented because their lytic activity can slow down milk acidification, causing delay in the production and even total loss of production (Garneau and Moineau, 2011; Pujato et al., 2019). Consequently, the most studied dairy phages are *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* and *Leuconostoc* phages, infecting the main starter cultures (Marcó et al., 2012). Recently, viral metagenomics was used to characterize the bacteriophage community of dairy samples such as whey (Muhammed et al., 2017) or cheeses (Dugat-Bony et al., 2020; Queiroz et al., 2022), shedding light on the existence of a diversity much wider than in dairy samples and suggesting that many other cheese bacteria are subjected to phage predation.

Only few studies report the isolation of virulent phages from cheese infecting ripening bacteria, *i.e.* *Propionibacterium freudeunreichii* and *Brevibacterium aurantiacum* (Cheng et al., 2018; de Melo et al., 2020; Gautier et al., 1995). We also isolated in a previous work five new virulent phages, targeting *Glutamicibacter arilaitensis*, *Brevibacterium aurantiacum*, *Psychrobacter aquimaris* and *Leuconostoc falkenbergense*, from the surface of a French smear-ripened cheese suggesting that predation is likely to occur on the cheese surface for most of the dominant bacteria (Paillet et al., 2022). However, little is known about their ecology. In this study, the objective was to deepen our knowledge about bacteriophage ecology in the same type of cheese by studying the dynamic of the surface virome during the ripening process and to evaluate the persistence of phages on the cheese surface across production years.

Material and methods

Cheese samples

(i) Dynamic study design: french smear-ripened cheeses from a single batch of production were analysed at five steps during the ripening process (noted W1 to W5), each after a distinct washing step (Figure 1). The first three washes were performed with a NaCl solution and the two last with a NaCl solution containing increasing concentrations of alcoholic liquor. Three different cheeses were sampled at each step and used as replicates (noted A, B and C). Cheeses were immediately stored at 4°C after sampling and transported to the laboratory within 48h.

(ii) Persistence study design: ready-to-consume cheeses of the same type and same brand as the previously described cheeses were purchased in the local supermarket in December 2017, November 2019 and February 2022 spanning >4 years of production. Three different cheeses, with the same date of production, were sampled each year and used as replicates. Cheeses were immediately transported to the laboratory and stored at 4°C until processing. Metavirome data corresponding to samples from December 2017 were already available in public repositories (Bioproject number: PRJNA497596; SRA identifiers: SRX4907949, SRX4907945, SRX4907941) and were used in this study for the comparison with the newly generated data.

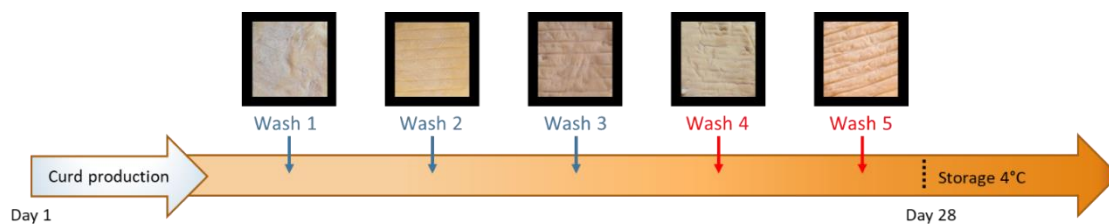


Figure 1: Schematic representation of the experimental plan followed for the dynamic study of the virome composition during the ripening process. Samples were respectively obtained after each washing step (arrows).

For both dynamic and persistence studies, cheese samples were analysed immediately after reception at the lab. Rind was gently separated from the core using sterile knives, mixed using a blender and processed in order to extract both viral DNA for metavirome analysis and microbial DNA for amplicon sequencing (16S metabarcoding).

Viral DNA extraction and metavirome analysis

Extraction of the viral fraction from cheese rind was performed according to protocol P4 detailed in (Dugat-Bony et al., 2020) comprising a filtration step and a chloroform treatment. DNA was extracted from the viral particles according to the protocol described in the same study and sent to Eurofins Genomics for high throughput sequencing using the Illumina NovaSeq platform (2 × 150 bp paired-end reads).

All the details about the tools, versions and parameters used in the following pipeline are available in scripts deposited in the GitLab repository (https://forgemia.inra.fr/eric.dugat-bony/cheese_virome). Briefly, raw reads were quality filtered using Trimmomatic v0.39 (Bolger

et al., 2014). Then one assembly was computed for the collection of triplicate reads from each sample with Spades v3.15.3 (Bankevich et al., 2012) by using either the complete dataset of trimmed reads available or after subsampling the dataset to 1.5 million, 150 000 or 15 000 trimmed reads per sample. We noted that some abundant contigs were better assembled after subsampling. Contigs of length >2kb from all assemblies were selected and clustered at 95% identity using cd-hit v4.8.1 (Li and Godzik, 2006). Finally, the longest contig within each cluster was selected as representative sequence in the final contig dataset (4222 contigs).

The quality of metavirome-assembled viral genomes was assessed using CheckV v0.8.1 (Nayfach et al., 2021). All sequences retained in the final virome were those qualified as viral with both VIBRANT v1.2.1 (Kieft et al., 2020) and VirSorter2 v2.2.3 (Guo et al., 2021). In order to evaluate the abundance of each contig in each metavirome sample, trimmed reads were mapped against the virome using BWA v0.7.17 (Li and Durbin, 2009) and counted with Rsamtools v1.0.0 profile with the options --multi=equal --unit=ab -nolen (<https://github.com/arumugamlab/msamtools>). The output files from all samples were joined into an abundance table and processed using the R package phyloseq v1.38.0 (McMurdie and Holmes, 2013). For each experimental dataset (dynamic study, persistence study), read counts were rarefied to the minimum depth observed in one individual sample. Then, read counts were normalized to contigs length and transformed to relative abundances, in order to enable both comparison of the viral community structure between samples and comparison of the abundance level between contigs. Bray-Curtis dissimilarity index, as computed by the distance function from the R package phyloseq, were used to compare viral communities between samples and the effect of different variables on this structure was assessed using permutational analysis of variance as computed by the adonis2 function from the R package vegan v2.6-2.

For the dynamic dataset, differential analysis was performed on raw counts using the DESeq function implemented in the DESeq2 package v1.38.0 (Love et al., 2014). Indeed, this function already includes a normalization step (by the median of ratios method).

In order to identify which of our assembled phage contigs corresponded to already known phages, the most abundant contigs in the whole dataset (average normalized relative abundance > 0.01) and the differentially abundant contigs from the dynamic study (adjusted pvalue > 0.01, log2 fold change >3 and average raw counts > 1500) were compared to the nr/nt NCBI database using BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) with default

parameters (megablast, E-value > 0.05) and specifying the "viruses (taxid:10239)" in the "Organism" option. From the best hit result, the name of the closest relative (or metagenome when no known phage was in the list) was retained and both the host genus and phage lifestyle (virulent or temperate) was deduced from the literature.

Microbial DNA extraction and 16S metabarcoding profiles

DNA extraction from the cheese surface was performed as previously described (Dugat-Bony et al., 2016). PCR amplification of the V3-V4 regions of the 16S rRNA gene was performed with the primers V3F (5'-ACGGRAGGCWGCAG-3') and V4R (5'-TACCAGGGTATCTAATCCT-3') carrying the Illumina 5'-CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT-3' and the 5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3' tails, respectively. The reaction was performed using 10 ng of extracted DNA, 0.5 μ M primer, 0.2 mM dNTP, and 2.5 U of the MTP Taq DNA polymerase (Sigma-Aldrich, USA). The amplification was carried out using the following program: 94°C for 60 s, 30 cycles at 94°C for 60 s, 65°C for 60 s, 72°C for 60 s, and a final elongation step at 72°C for 10 min. The resulting PCR products were sent to the @BRIDGE platform (INRAE, Jouy-en-Josas, France) for library preparation and sequencing. Briefly, amplicons were purified using a magnetic beads CleanPCR (Clean NA, GC biotech B.V., The Netherlands), the concentration was measured using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) and the amplicon quality was assessed on a Fragment Analyzer (AATI, USA) with the reagent kit ADNdb 910 (35-1,500 bp). Sample multiplexing was performed by adding tailor-made 6 bp unique indexes during the second PCR step which was performed on 50–200 ng of purified amplicons using the following program: 94°C for 10 min, 12 cycles at 94°C for 60 s, 65°C for 60 s, 72°C for 60 s, and a final elongation step at 72°C for 10 min. After purification and quantification (as described above), all libraries were pooled with equal amounts in order to generate equivalent number of raw reads for each library. The DNA concentration of the pool was quantified on a Qubit Fluorometer (ThermoFisher Scientific, USA) and adjusted to a final concentration between 5 and 20 nM for sequencing. The pool was denatured (NaOH 0.1N) and diluted to 7 pM. The PhiX Control v3 (Illumina, USA) was added to the pool at 15% of the final concentration, as described in the Illumina procedure, and the mixture was loaded onto the Illumina MiSeq cartridge according to the manufacturer's instructions using MiSeq Reagent Kit v3 (2 × 250 bp paired-end reads).

Paired-end reads were analysed using FROGS v3.2 (Escudié et al., 2017), according to the standard operating procedure. Briefly, operational taxonomic units (OTUs) were built using Swarm with an aggregation distance of 1 and the --fastidious option (Mahé et al., 2014), and each OTU that accounted for <0.005% of the total dataset of sequences was discarded, as previously recommended (Bokulich et al., 2013). Lastly, the OTU's affiliation was checked using the EzBiocloud database v52018 (Yoon et al., 2017). The abundance table was processed using the R package phyloseq v1.38.0 (McMurdie and Holmes, 2013).

Results

Composition of the cheese surface virome

The sequence assembly obtained from all the studied samples (15 from the dynamic study and 9 from the persistence study) led to the production of a metavirome composed of 4222 contigs >2 Kb considered of viral origin (Table 1). Most of these contigs (4177) were detected in samples from the dynamic study and almost half (2137) were detected in the persistence study.

Table 1: summary statistics about the metavirome dataset.

	Complete dataset (24 samples)	Dynamic study (15 samples)	Persistence study (9 samples)
Total number of contigs > 2 Kb	4222	4177	2137
Number of abundant contigs (av. normalized relative abundance > 0.0001)	690	426	299
Number of contigs analysed by BLASTn search		204	

A BLASTn search for related phages in databases was performed on 204 of the 4222 contigs (very abundant contigs in the complete dataset and differentially abundant contigs in the dynamic study). The most abundant phages detected in the dataset were *Glutamicibacter* phage Montesquieu and *Lactococcus* phages (Table 2). The 204 blasted contigs represented almost 75% of the relative abundance of the dataset and among them, those with no match with already known viral sequences in the NCBI database represented only 0.3% of the relative abundance. Of importance, the five virulent phages previously isolated from the same cheese, namely Montesquieu, Voltaire, Rousseau, D'Alembert and Diderot were detected. One contig

of 13,887 bp partially matching with the genome of *Brevibacterium* phage AGM13 (88% identity at the nucleotidic level with coverage value of 10%), previously isolated from a Canadian wash-rind cheese, was also identified (de Melo et al. 2020).

Table 2: Most abundant phages detected on the cheese metavirome. Phages previously isolated from smear-ripened cheeses are indicated in bold.

Closest relatives	Relative abundance
<i>Lactococcus</i> phages*	0.499
<i>Glutamicibacter</i> phage Montesquieu	0.229
<i>Psychrobacter</i> phage pOW20-A	0.005
MAG TPA_asm Siphoviridae sp. isolate ct3i11	0.002
<i>Pseudoalteromonas</i> phage SL25	0.002
<i>Glutamicibacter</i> phage BIM BV-113	0.001
<i>Brevibacterium</i> phage Rousseau	0.001
<i>Arthrobacter</i> phage Seahorse	0.001
<i>Streptococcus</i> satellite phage Javan613	0.001
<i>Vibrio</i> phage vB_VhaP_VH-5	4.58E-04
<i>Vibrio</i> phage vB_VaM_H2	4.27E-04
<i>Pseudoalteromonas</i> phage C5a	3.30E-04
<i>Brevibacterium</i> phage AGM13	2.56E-04
<i>Vibrio</i> phage VP585	2.32E-04
<i>Vibrio</i> phage 1.202.O._10N.222.45.E8	2.23E-04
<i>Aeromonas</i> phage vB_AsaM_LPM4	2.07E-04
MAG TPA_asm Siphoviridae sp. isolate ctNvB2	1.75E-04
MAG TPA_asm: Siphoviridae sp. ctHip2	1.65E-04
MAG TPA_asm Myoviridae sp. isolate ctvFW73	1.55E-04
<i>Dickeya</i> phage phiDP10.3	1.44E-04
MAG TPA_asm Caudovirales sp. isolate cteOE8	1.33E-04
<i>Streptococcus</i> phage phiZJ20091101-2	1.31E-04
MAG TPA_asm: Siphoviridae sp. isolate ctkN83	1.22E-04
<i>Psychrobacter</i> phage D'Alembert	9.66E-05
<i>Proteus</i> phage vB_PvuS_Pm34	9.61E-05
<i>Pseudoalteromonas</i> phage H105/1	5.75E-05
<i>Leuconostoc</i> phage Diderot	4.54E-05
uncultured Mediterranean phage	2.45E-05
<i>Glutamicibacter</i> phage Voltaire	1.25E-05
No close relatives	0.003
Remaining contigs not blasted (4018 contigs)	0.254

*The relative abundance value corresponds to the sum of the values obtained for all contigs matching with the same closest relative phage genome.

**contigs matching with several *Lactococcus* phages were detected including P1048, 949, LW81, phiL47, WRP3, AM12, AM5 and 936 (for the most abundant).

The composition of the viral community present on the cheese surface evolves through the ripening process

The effect of each production step on the cheese virome composition was assessed by computing both Bray-Curtis dissimilarity (BC) and Jaccard distances (JC). The PERMANOVA test indicated a significant effect of this variable on both BC and JC matrix (p-value = 0.001) with high R^2 values (0.649 and 0.605, respectively) and the principal coordinate analysis revealed that the first axis clearly discriminates samples from the first 3 washes and samples from the two last washes (Figure 2A and supplement Figure 1). The second axis helps discriminating samples from W3 and samples from W1 and 2. Regarding the viral diversity, estimated by the Shannon index, we observed a slight decrease from W3 but the effect was not significant, indicating no major changes with the production step ($p > 0.05$, Kruskal-Wallis test; Figure 2B).

In order to visualize the abundance of the different viral contigs in the samples, we kept only the most abundant contigs (426 contigs with an averaged normalized relative abundance value > 0.0001) and used a heatmap (Figure 2C). Three blocks of contigs were detected *i.e.* one block with contigs whose abundance does not vary with the ripening step, one block with contigs whose abundance increased with ripening (or appeared), one block with contigs whose abundance decreased with ripening (or disappeared). As already observed by the principal coordinate analysis of the Bray-Curtis dissimilarity (Figure 2A), the virome composition was similar between samples from W1 and W2, and between samples from W4 and W5. Samples from W3 exhibited a composition in between samples from W1-2 and washes W4-5 reflecting a transition stage captured by those samples.

We then applied the DESeq2 method to identify differentially abundant viral contigs between the two stable stages represented by W1-2 and W4-5 samples (Figure 2D). Interestingly, all contigs homologous to known phages infecting starter cultures, such as *Lactococcus* and *Streptococcus* phages, had a $\log_2FC < -3$ meaning their relative abundances were higher at the

beginning of ripening than at the end. Conversely, contigs matching with genomes from virulent phages targeting non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and ripening bacteria (e.g. *Leuconostoc*, *Brevibacterium*, *Glutamicibacter*, *Aeromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*) were over-detected in W4-5 samples compared to W1-2 samples ($\log_2\text{FoldChange} > 3$) reflecting a higher population level for such phages on the cheese surface in later ripening stages. Interestingly, we detected among them several contigs with a high similarity to the genome of three virulent phages (>99% identity at the nucleotidic level with coverage values >90%) previously isolated from the same surface-ripened cheese as the one studied here, namely *Glutamicibacter* phage Montesquieu, *Leuconostoc* phage Diderot and *Brevibacterium* phage Rousseau and the contig sharing a little homology with the genome of *Brevibacterium* phage AGM13 (88% identity at the nucleotidic level with coverage value of 10%), which was isolated from a Canadian washed-rind cheese.

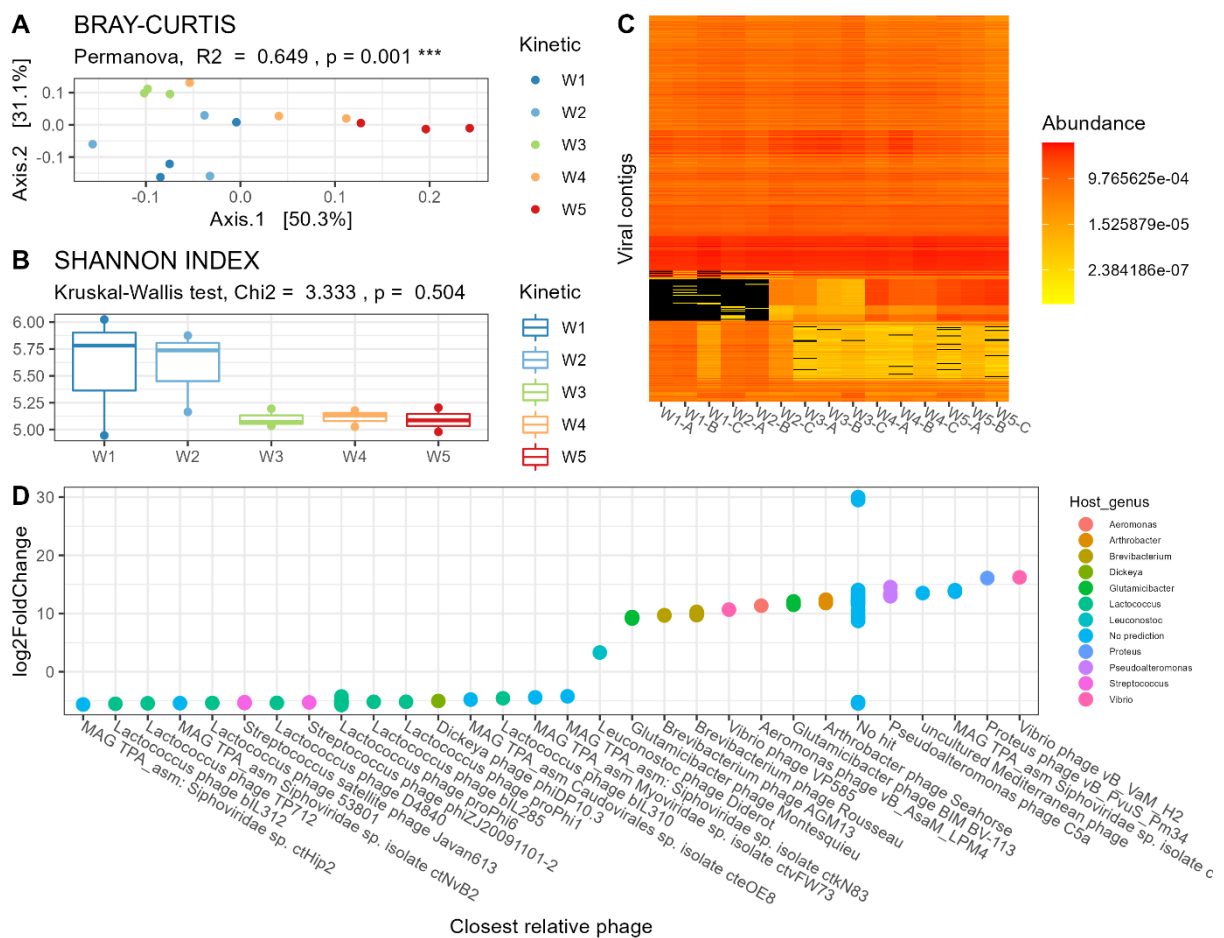


Figure 2: Dynamic of the cheese surface virome along the ripening process. A) Principal coordinate analysis of the Bray-Curtis dissimilarity. Samples are coloured according the ripening step. B) Comparison of the viral diversity, estimated by the Shannon index, at the different ripening steps. C) Heatmap representing the normalized relative abundance of the most abundant contigs (426 contigs with an averaged normalized relative abundance value > 0.0001) in each sample. D) Log2FoldChange values obtained for differentially abundant contigs. Each dot represent one contig and all contigs with the same assignation (closest relative phage) are grouped on the same column. Points are coloured according to the host genus of the predicted phage. No hit: contigs with no close relative phage identified by BLASTn search. No prediction: no host genus predicted based on sequence analysis.

The composition of the bacterial community of the cheese surface also varied through the ripening process (Figure 3). As for the virome composition, we observed a clear transition in the bacterial community structure from W3. *Lactococcus* was the dominant taxon in samples from W1 and W2, and was progressively replaced by typical surface bacteria such as members of *Psychrobacter*, *Vibrio*, *Glutamicibacter* and *Pseudoalteromonas* genera. This indicated that changes observed on the phage community structure is strongly associated with bacterial successions on the cheese surface.

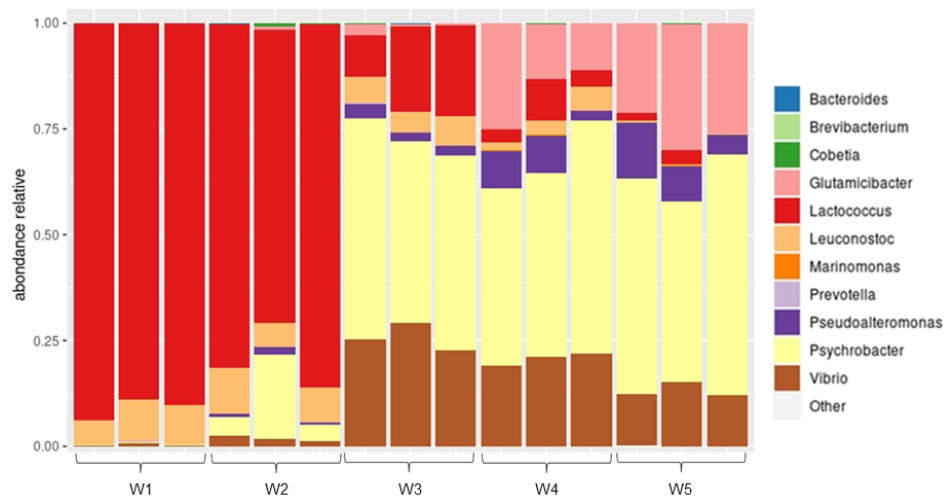


Figure 3: Dynamic of the bacterial community of the cheese surface along the ripening process. The composition of the bacterial community was assessed by a metabarcoding approach targeting the V3-V4 regions of the 16S rRNA gene. Three different cheeses from the same batch were analysed at each sampling point. Data were aggregated at the genus level for visualization.

The dominant fraction of the cheese virome persists across production years

The effect of the production year (2017, 2019 and 2022) on the composition of the virome of the cheese surface (ready-to-consume cheeses) was assessed by computing both Bray-Curtis

dissimilarity (Figure 4A) and Jaccard distances (not shown). The PERMANOVA test indicated a significant effect of this factor using both distance matrix as input (p-value of 0.002 for both, R2 values of 0.807 and 0.756 respectively) suggesting structural variations of the phage community across production years. The principal coordinate analysis revealed that the first axis clearly discriminates 2019 samples from 2017 and 2022 samples. The second axis helps discriminating samples from years 2017 and 2022.

The heatmap visualization showed that the vast majority of the most abundant contigs were shared among the 3 production years and that only a few low-abundant contigs were detected specifically in one or two production years (black zones on the graph) (Figure 4B).

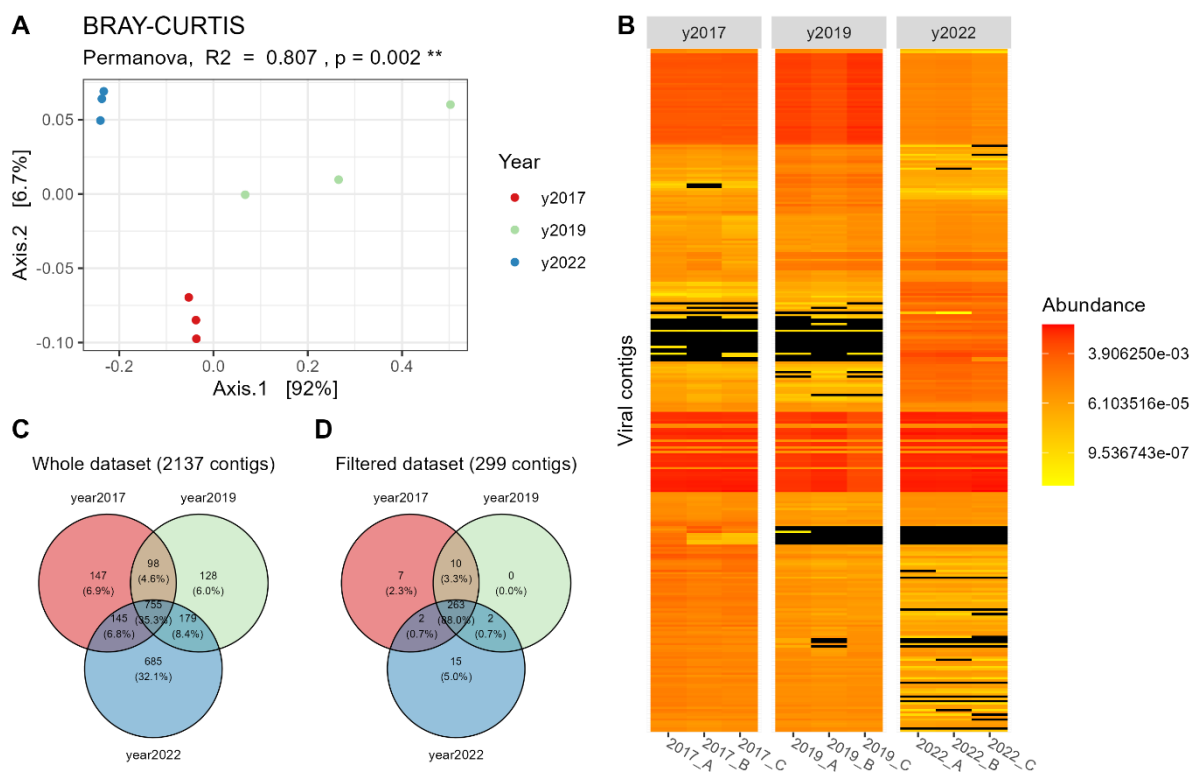


Figure 4: Persistence of the cheese surface virome across production years. A) Principal coordinate analysis of the Bray-Curtis dissimilarity. Samples are coloured according the production year (2017, 2019 and 2022). B) Heatmap representing the normalized relative abundance of the most abundant contigs (299 contigs with an averaged normalized relative abundance value > 0.0001) in each sample. C) Venn diagram constructed from the whole dataset comprising 2137 viral contigs. D) Venn diagram constructed from the filtered dataset comprising 299 contigs with an averaged normalized relative abundance value > 0.0001.

In order to visualize the number of shared/unique contigs per production year, we used a Venn diagram. When using the whole dataset (Figure 4C), we observed that 35.3% of the 2137 contigs present in at least one of the three years, were shared in all production years (55.1% in two different production years). Interestingly, samples from year 2022 had a higher number of unique contigs (685 contigs, 32.1% of the total) than samples from years 2017 and 2019 (147 and 128 contigs, respectively). We next applied the same analysis only on the most abundant contigs (average normalized relative abundance > 0.0001, 299 contigs in total) (Figure 4D). The vast majority of the contigs, *i.e.* 88.0%, were shared among the 3 production years and this value rose to 92.6% when considering only two different years. This result indicates that the cheese surface virome was mostly stable in terms of composition (presence/absence) and that dominant phages persist across production years. The difference between production years revealed with the beta-diversity analysis was therefore mostly due to low-abundant contigs.

Discussion

Recent studies of cheese samples using viral metagenomics (Dugat-Bony et al., 2020; Queiroz et al., 2022) or exploration of cheese microbial metagenomes (Walsh et al., 2020) have revealed that cheese is an environment harbouring a diverse bacteriophage community whose targets go beyond lactic acid starter cultures. The isolation of a few representatives of these non-starter phages (de Melo et al., 2020; Gautier et al., 1995; Paillet et al., 2022), all of which being virulent, suggests that phage predation occurs in this ecosystem, raising the question of their overall impact on microbial successions during the ripening process. In this study, we produced the metavirome of a French smear ripened cheese by combining sequence data derived from viral particles purified from both cheeses collected at different steps of the ripening process, and ready-to-consume cheeses from different production years. This metavirome was highly dominated by contigs corresponding to diverse *Lactococcus* phages and *Glutamicibacter* phage Montesquieu (totalling > 72% of the relative abundance), the latter being a virulent phage isolated from the same type of cheese in a previous study and infecting the ripening bacteria *Glutamicibacter arilaitensis* (Paillet et al., 2022). Several other phages were detected as sub-populations but only few of them were related to dairy phages (namely *Brevibacterium* phages Rousseau and AGM13, *Leuconostoc* phage Diderot, *Psychrobacter* phage d'Alembert and *Glutamicibacter* phage Volaitre) highlighting the need to isolate more representative phages

from this ecosystem. In particular, contigs partially matching with genomic sequences from phages infecting halotolerant bacteria (e.g. *Pseudoalteromonas*, *Halomonas*, *Vibrio* and *Proteus* species), which are not deliberately inoculated in smear-ripened cheese but are generally dominant at the end of ripening (Kothe et al., 2021), were detected and should be targeted through future isolation efforts.

The dynamic of microbial communities has been extensively studied in a wide diversity of cheese products during ripening (De Pasquale et al., 2014; Flórez and Mayo, 2006; Fuka et al., 2013; Irlinger and Monnet, 2021; Larpin et al., 2006; Pangallo et al., 2014), enabling to accurately describe microbial successions occurring in cheese production processes (Mayo et al., 2021). Here, we report the first study of metavirome dynamics during cheese ripening with the aim of extending this knowledge to the viral part of the system. As for bacteria and fungi, we observed a clear transition in the metavirome composition during the ripening process, with some contigs corresponding to LAB starter-phages (mainly targeting *Lactococcus lactis*) being replaced by contigs corresponding to phages infecting NSLAB and ripening bacteria. When comparing with the bacterial kinetic, we observed a strong association between phage dynamics and the bacterial successions on the cheese surface, the abundance of phages increasing with the abundance of their predicted hosts. This result is of importance since the increase in the relative abundance of a phage contigs in a metavirome is a first clue that suggests active replication of the corresponding phage, and thus the existence of a prey-predator relationship in the studied ecosystem. Surprisingly, the relative abundance of some phage contigs remains very stable during ripening, despite the observed bacterial dynamic. Those contigs mainly corresponded to genomic sequences derived from *Lactococcus* phages (data not shown). Since *Lactococcus lactis* grow mainly during milk acidification and remains pretty stable in terms of concentration during the ripening period in this type of cheese (Irlinger and Monnet, 2021), we hypothesized that this result reflects the basal induction of *Lactococcus* prophages, as already observed for other temperate phages (De Paepe et al., 2016).

Cheese microbial communities of washed-rind cheese are generally dominated by environmental microorganisms detected in processing environments, also called the “house” microbiota (Bokulich and Mills, 2013), which is specific to each production facility and provides a microbial signature distinguishing cheeses belonging to the same variety but manufactured by distinct producers (Dugat-Bony et al., 2016). Recently, the analysis of several Quebec’s

terroir cheeses revealed that the dominant microorganisms remain stable from year to year, which could be linked to typical manufacturing practices and consistency in the use of starter and ripening cultures by cheesemakers (Raymond-Fleury et al., 2022). Here, we describe a similar observation for bacteriophages. We indeed identified a core-virome composing of a large proportion of the most abundant contigs being consistently detected across five production years. Previous work on an undefined starter culture used for the production of Swiss-type cheese, which has been propagated for decades in the same dairy environment, revealed that phages and bacteria stably coexist over time in this system and suggests that this may contribute to the stable maintenance of the cheese starter culture over years (Somerville et al., 2021). The same may apply for phages and bacteria on the surface of smear-ripened cheese since both are contaminating the cheese production environment are therefore likely to repeatedly contaminate cheese from one production cycle to another (Bokulich and Mills, 2013; Paillet et al., 2022).

In conclusion, both the dynamic of the cheese metavirome during the ripening period and its relative persistence across production years support an important role of bacteriophages in the cheese microbial ecosystem. This biotic factor should therefore be taken into account in order to understand the microbial successions that occur during milk fermentation and could provide cheesemakers with new levers of action to control their production process.

Acknowledgements

For the metabarcoding analysis, this work has benefited from the facilities and expertise of @BRIDGe (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350 Jouy-en-Josas, France). We are also grateful to the INRAE MIGALE bioinformatics facility (MIGALE, INRAE, 2020. Migale bioinformatics Facility, doi: 10.15454/1.5572390655343293E12) for providing computing and storage resources.

References

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its

applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19, 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>

Bokulich, N.A., Mills, D.A., 2013. Facility-Specific “House” Microbiome Drives Microbial Landscapes of Artisan Cheesemaking Plants. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 5214–5223. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>

Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

Brown, T.L., Charity, O.J., Adriaenssens, E.M., 2022. Ecological and functional roles of bacteriophages in contrasting environments: marine, terrestrial and human gut. *Current Opinion in Microbiology* 70, 102229. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102229>

Cheng, L., Marinelli, L.J., Grosset, N., Fitz-Gibbon, S.T., Bowman, C.A., Dang, B.Q., Russell, D.A., Jacobs-Sera, D., Shi, B., Pellegrini, M., Miller, J.F., Gautier, M., Hatfull, G.F., Modlin, R.L., 2018. Complete genomic sequences of *Propionibacterium freudenreichii* phages from Swiss cheese reveal greater diversity than *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* phages. *BMC Microbiology* 18, 19. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1159-y>

Corsetti, A., Rossi, J., Gobbetti, M., 2001. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology, Yeast in Dairy Products* 69, 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00567-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00567-0)

de Melo, A.G., Rousseau, G.M., Tremblay, D.M., Labrie, S.J., Moineau, S., 2020. DNA tandem repeats contribute to the genetic diversity of *Brevibacterium aurantiacum* phages. *Environmental Microbiology* 22, 3413–3428. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15113>

De Paepe, M., Tournier, L., Moncaut, E., Son, O., Langella, P., Petit, M.-A., 2016. Carriage of λ Latent Virus Is Costly for Its Bacterial Host due to Frequent Reactivation in Monoxenic Mouse Intestine. *PLoS Genet* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005861>

De Pasquale, I., Di Cagno, R., Buchin, S., De Angelis, M., Gobbetti, M., 2014. Microbial Ecology Dynamics Reveal a Succession in the Core Microbiota Involved in the Ripening of Pasta Filata Caciocavallo Pugliese Cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 6243–6255. <https://doi.org/10.1128/AEM.02097-14>

Delcenserie, V., Taminiau, B., Delhalle, L., Nezer, C., Doyen, P., Crevecoeur, S., Roussey, D., Korsak, N., Daube, G., 2014. Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. *Journal of Dairy Science* 97, 6046–6056. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8225>

Dugat-Bony, E., Garnier, L., Denonfoux, J., Ferreira, S., Sarthou, A.-S., Bonnarme, P., Irlinger, F., 2016. Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *International Journal of Food Microbiology* 238, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.026>

Dugat-Bony, E., Lossouarn, J., De Paepe, M., Sarthou, A.-S., Fedala, Y., Petit, M.-A., Chaillou, S., 2020. Viral metagenomic analysis of the cheese surface: A comparative study of rapid procedures for extracting viral particles. *Food Microbiology* 85, 103278. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103278>

Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2017. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>

Feurer, C., Irlinger, F., Spinnler, H. e., Glaser, P., Vallaey, T., 2004. Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced vs a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods. *Journal of Applied Microbiology* 97, 546–556. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02333.x>

Flórez, A.B., Mayo, B., 2006. Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology* 110, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.016>

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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080734>

Garneau, J.E., Moineau, S., 2011. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microb Cell Fact* 10 Suppl 1, S20. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S20>

Gautier, M., Rouault, A., Sommer, P., Briandet, R., 1995. Occurrence of *Propionibacterium freudenreichii* bacteriophages in swiss cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2572–2576.

Guo, J., Bolduc, B., Zayed, A.A., Varsani, A., Dominguez-Huerta, G., Delmont, T.O., Pratama, A.A., Gazitúa, M.C., Vik, D., Sullivan, M.B., Roux, S., 2021. VirSorter2: a multi-classifier, expert-guided approach to detect diverse DNA and RNA viruses. *Microbiome* 9, 37. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00990-y>

Irlinger, F., Monnet, C., 2021. Temporal differences in microbial composition of Époisses cheese rinds during ripening and storage. *Journal of Dairy Science* 104, 7500–7508. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20123>

Irlinger, F., Mounier, J., 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology* 20, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.02.016>

Kieft, K., Zhou, Z., Anantharaman, K., 2020. VIBRANT: automated recovery, annotation and curation of microbial viruses, and evaluation of viral community function from genomic sequences. *Microbiome* 8, 90. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00867-0>

Kothe, C.I., Bolotin, A., Kraïem, B.-F., Dridi, B., Renault, P., 2021. Unraveling the world of halophilic and halotolerant bacteria in cheese by combining cultural, genomic and

- metagenomic approaches. *International Journal of Food Microbiology* 358, 109312. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109312>
- Larpin, S., Mondoloni, C., Goerges, S., Vernoux, J.-P., Guéguen, M., Desmasures, N., 2006. *Geotrichum candidum* dominates in yeast population dynamics in Livarot, a French red-smear cheese. *FEMS Yeast Research* 6, 1243–1253. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00127.x>
- Larpin-Laborde, S., Imran, M., Bonaïti, C., Bora, N., Gelsomino, R., Goerges, S., Irlinger, F., Goodfellow, M., Ward, A.C., Vancanneyt, M., Swings, J., Scherer, S., Guéguen, M., Desmasures, N., 2011. Surface microbial consortia from Livarot, a French smear-ripened cheese. *Canadian Journal of Microbiology* 57, 651–660. <https://doi.org/10.1139/w11-050>
- Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D., Labrie, S., 2012. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Sci. & Technol.* 92, 455–468. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0051-4>
- Ledormand, P., Desmasures, N., Dalmaso, M., 2020. Phage community involvement in fermented beverages: an open door to technological advances? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1–10. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1790497>
- Li, H., Durbin, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- 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. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- 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. <https://doi.org/10.7717/peerj.593>
- Marcó, M.B., Moineau, S., Quiberoni, A., 2012. Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage* 2, 149–158. <https://doi.org/10.4161/bact.21868>
- Mayo, B., Rodríguez, J., Vázquez, L., Flórez, A.B., 2021. Microbial Interactions within the Cheese Ecosystem and Their Application to Improve Quality and Safety. *Foods* 10, 602. <https://doi.org/10.3390/foods10030602>
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLOS ONE* 8, e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Mounier, J., Coton, M., Irlinger, F., Landaud, S., Bonnarme, P., 2017. Chapter 38 - Smear-Ripened Cheeses, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese* (Fourth Edition). Academic Press, San Diego, pp. 955–996. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00038-7>

Mounier, J., Gelsomino, R., Goerges, S., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Scherer, S., Swings, J., Fitzgerald, G.F., Cogan, T.M., 2005. Surface Microflora of Four Smear-Ripened Cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6489–6500. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6489-6500.2005>

Mounier, J., Monnet, C., Jacques, N., Antoinette, A., Irlinger, F., 2009. Assessment of the microbial diversity at the surface of Livarot cheese using culture-dependent and independent approaches. *International Journal of Food Microbiology* 133, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.020>

Muhammed, M.K., Kot, W., Neve, H., Mahony, J., Castro-Mejía, J.L., Krych, L., Hansen, L.H., Nielsen, D.S., Sørensen, S.J., Heller, K.J., Sinderen, D. van, Vogensen, F.K., 2017. Metagenomic analysis of dairy bacteriophages: extraction method and pilot study on whey samples derived from using undefined and defined mesophilic starter cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e00888-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00888-17>

Nayfach, S., Camargo, A.P., Schulz, F., Eloë-Fadrosch, E., Roux, S., Kyrpides, N.C., 2021. CheckV assesses the quality and completeness of metagenome-assembled viral genomes. *Nat Biotechnol* 39, 578–585. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-00774-7>

Paillet, T., Dugat-Bony, E., 2021. Bacteriophage ecology of fermented foods: anything new under the sun? *Current Opinion in Food Science* 40, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.03.007>

Paillet, T., Lossouarn, J., Figueroa, C., Midoux, C., Rué, O., Petit, M.-A., Dugat-Bony, E., 2022. Virulent Phages Isolated from a Smear-Ripened Cheese Are Also Detected in Reservoirs of the Cheese Factory. *Viruses* 14, 1620. <https://doi.org/10.3390/v14081620>

Pangallo, D., Šaková, N., Koreňová, J., Puškárová, A., Kraková, L., Valík, L., Kuchta, T., 2014. Microbial diversity and dynamics during the production of May bryndza cheese. *International Journal of Food Microbiology* 170, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.015>

Pujato, S. a., Quiberoni, A., Mercanti, D. j., 2019. Bacteriophages on dairy foods. *Journal of Applied Microbiology* 126, 14–30. <https://doi.org/10.1111/jam.14062>

Queiroz, L.L., Lacorte, G.A., Isidorio, W.R., Landgraf, M., de Melo Franco, B.D.G., Pinto, U.M., Hoffmann, C., 2022. High Level of Interaction between Phages and Bacteria in an Artisanal Raw Milk Cheese Microbial Community. *mSystems* 0, e00564-22. <https://doi.org/10.1128/msystems.00564-22>

Quigley, L., O’Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D., 2012. High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 5717–5723. <https://doi.org/10.1128/AEM.00918-12>

Raymond-Fleury, A., Lessard, M.-H., Chamberland, J., Pouliot, Y., Dugat-Bony, E., Turgeon, S.L., St-Gelais, D., Labrie, S., 2022. Analysis of Microbiota Persistence in Quebec’s Terroir Cheese Using a Metabarcoding Approach. *Microorganisms* 10, 1381. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071381>

Rea, M.C., Görge, S., Gelsomino, R., Brennan, N.M., Mounier, J., Vancanneyt, M., Scherer, S., Swings, J., Cogan, T.M., 2007. Stability of the Biodiversity of the Surface Consortia of Gubbeen, a Red-Smear Cheese. *Journal of Dairy Science* 90, 2200–2210. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-377>

Somerville, V., Berthoud, H., Schmidt, R.S., Bachmann, H.-P., Meng, Y.H., Fuchsmann, P., von Ah, U., Engel, P., 2021. Functional strain redundancy and persistent phage infection in Swiss hard cheese starter cultures. *ISME J* 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01071-0>

Walsh, A.M., Macori, G., Kilcawley, K.N., Cotter, P.D., 2020. Meta-analysis of cheese microbiomes highlights contributions to multiple aspects of quality. *Nat Food* 1, 500–510. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0129-3>

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. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.041>

Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., Chun, J., 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67, 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>

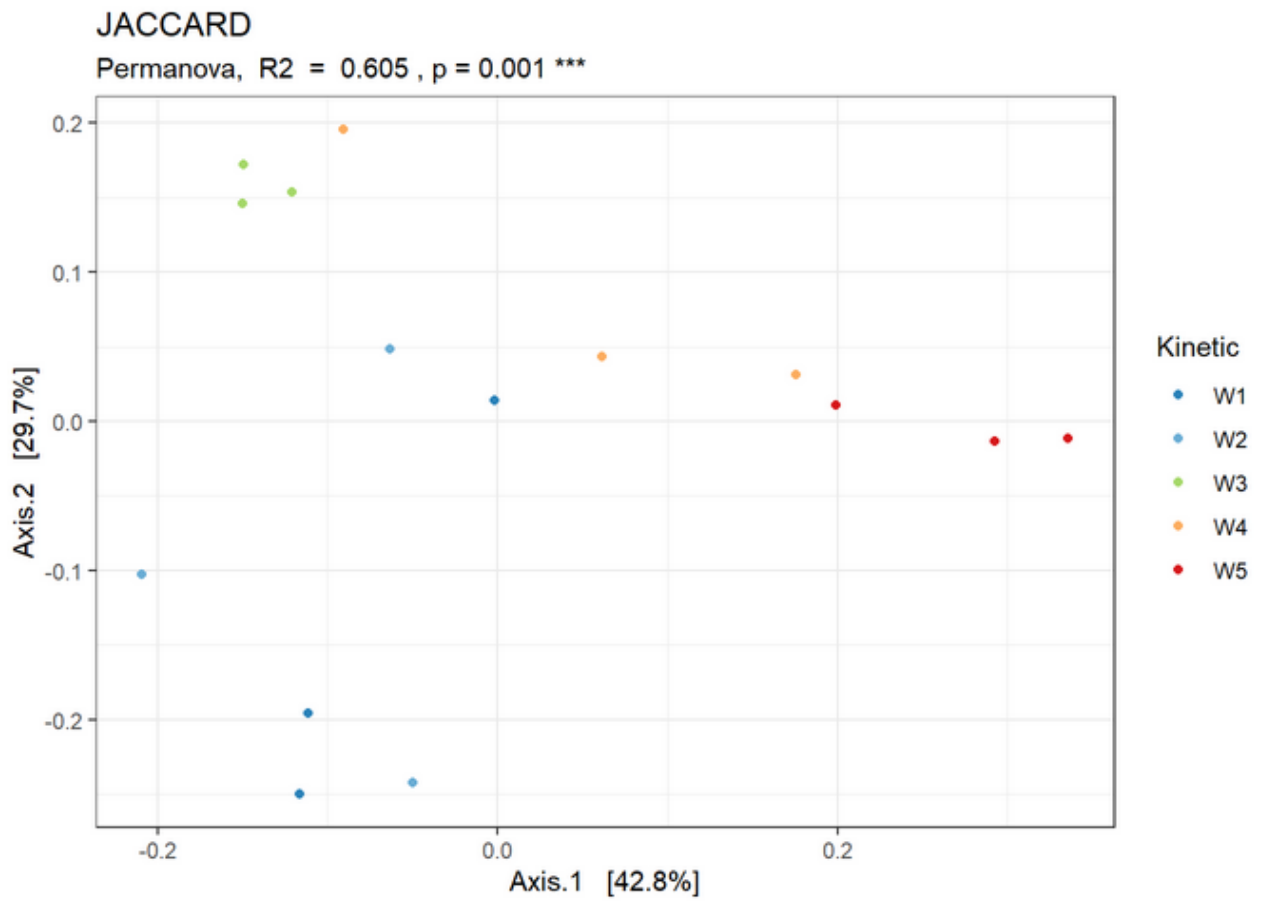


Figure S1 : Principal coordinate analysis of the Jaccard similarity (dynamic study).

Discussion

L'observation d'une dynamique au niveau de la communauté virale d'un fromage durant la période d'affinage représente un résultat important pour la compréhension du rôle écologique des phages dans cet écosystème. Il indique en effet qu'à l'instar de ce qui est connu pour les communautés bactériennes et fongiques (Pangallo et al. 2014), l'abondance et la nature des phages présents au cours de l'affinage évoluent. L'augmentation de l'abondance relative d'un contig phagique donné dans un métavirome constitue un élément tangible suggérant une réplication active du phage correspondant, et donc de l'existence d'une interaction de type prédation dans l'écosystème étudié. Dans le cas présent l'abondance relative des contigs phagiques suit celle de leurs hôtes bactériens prédits. Par exemple, les phages de bactéries d'affinage sont généralement plus abondants en fin d'affinage qu'au début. C'est notamment le cas pour les phages de *Glutamicibacter arilaitensis* (Montesquieu) et *Brevibacterium aurantiacum* (Rousseau et AGM13), deux espèces connues pour être régulièrementensemencées dans les fromages de type PMCL.

La stabilité du virome de la surface du fromage sur le long terme indique que les populations de phages les plus abondantes, qui pourraient être qualifiées de « core-virome », persistent dans l'environnement de production durant plusieurs années. Des résultats similaires ont été observés sur les communautés bactériennes et fongiques de plusieurs fromages (Raymond-Fleury et al. 2022). Si les pratiques d'ensemencement et de production ne varient pas, les microorganismes sélectionnés par le procédé sont donc probablement toujours identiques, de même que les virus qui les infectent. Cette information est donc importante pour le secteur de la production fromagère car elle permet d'imaginer de possibles stratégies pour limiter l'impact des phages sur les bactéries d'affinage (ex : rotation de cultures pour les ferments d'affinage), comme cela a déjà été mis en place pour lutter contre les phages de ferments lactiques (Marcó et al. 2012).

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre montrent de manière claire que les populations virales sont actives au cours de l'affinage. Il serait à présent intéressant de parvenir à décrire plus précisément les conséquences écologiques de cette activité sur la communauté microbienne du fromage dans son ensemble, et éventuellement d'étudier leur lien avec la qualité finale du produit.

Discussion générale et perspectives

De nombreux articles de recherche, décrivant la présence de phages dans des aliments fermentés, proposent qu'ils jouent un rôle écologique « majeur » dans ce type de produits. Toutefois, peu d'études se sont intéressées aux processus écologiques par lesquels ils pourraient influencer sur ces écosystèmes. Ce travail de thèse a donc eu pour ambition d'initier l'exploration du potentiel rôle écologique des phages dans un type particulier d'aliments fermentés, le fromage, et s'est concentré sur une catégorie spécifique de fromage, les PMCL. Deux approches ont été mises en œuvre pour atteindre cet objectif : un travail d'isolement et de caractérisation de phages représentatifs à partir d'échantillons de surface de fromages affinés, et une analyse de la composition des fractions virales purifiées à partir d'échantillons de surface de fromages prélevés soit durant le procédé d'affinage soit sur des produits prêt-à-consommer à l'aide d'une approche de métagénomique virale. L'isolement de plusieurs phages virulents ainsi que le suivi de leur dynamique et de leur persistance ne laissent que peu de doutes sur le fait qu'ils représentent un facteur biotique important de l'écosystème fromager. Pour autant, malgré la description de cinq nouveaux représentants, les résultats de l'analyse des métaviromes montrent à quel point la fraction virale de cet aliment reste méconnue. L'identification de plusieurs réservoirs dans l'environnement de production, en particulier des équipements et des surfaces de travail, nous éclaire également sur les modes de contaminations qui sont à l'origine de l'introduction de ces phages dans la chaîne de production. En somme, il reste encore à comprendre de quelle manière, et à quel point les phages impactent les successions microbiennes dans l'écosystème fromager.

« Les virus sont la forme de vie la plus abondante sur Terre » est-il souvent indiqué en introduction de très nombreuses publications, passées comme récentes. Il est estimé que les virus sont dix fois plus nombreux que les bactéries, dont la densité totale s'élève déjà à 10^{30} cellules environ (Breitbart et Rohwer 2005; Breitbart 2012). Cependant, le ratio phages/bactéries varie beaucoup d'un écosystème à l'autre, et pourrait remettre en cause cette estimation (Sullivan et al. 2017). Par exemple, les données de la littérature montrent que dans l'intestin humain, ce ratio est compris entre 0,001 et 0,1 pour 1, lorsqu'il est plutôt de 10 à 50 pour 1 dans les sols ou les environnements aquatiques (Maranger et Bird 1995; Williamson et al. 2005; Kim et al. 2011; Hoyles et al. 2014; Shkoporov et al. 2019). Or les chances de rencontres entre un phage et son hôte dépendent directement -mais pas uniquement- de leurs concentrations respectives (Wiggins et Alexander 1985; Bigwood et al. 2009). Ainsi, une

première approche pour explorer le rôle écologique d'un phage dans un écosystème est de chercher à savoir s'il a des chances de pouvoir rencontrer ses hôtes et de se répliquer. Il serait donc utile de connaître les concentrations de bactéries et de phages dans les systèmes étudiés. Au cours de mes travaux, les concentrations bactériennes de la surface du fromage PMCL affiné ont été systématiquement mesurées par dénombrement (5×10^9 UFC/g en moyenne sur les fromages affinés). Cependant, la concentration en phages, que ce soit à la surface du fromage ou dans les échantillons issus de l'environnement de production resterait à déterminer. L'interférométrie a déjà été utilisée pour obtenir une première estimation de la concentration en nanoparticules présentes à la surface de plusieurs fromages, autour de 10^9 à 10^{10} nanoparticules par gramme (Dugat-Bony et al. 2020). Cependant, en l'état actuel, les interféromètres ne détectent que les nanoparticules mesurant au moins 90 nm, et ne permettent pas de différencier facilement les particules virales des vésicules, leurs tailles étant généralement comprises entre 20 et 200 nm (Sausset et al. 2022). Il pourrait donc être intéressant d'utiliser d'autres méthodes plus robustes, comme la microscopie à épifluorescence ou la cytométrie en flux, mais une mise au point de protocoles pour permettre leur utilisation à partir d'échantillons de fromages reste nécessaire au préalable. Une autre approche permettant de s'approcher d'une information quantitative à partir de données métagénomiques (virale dans notre cas) pourrait être l'utilisation du « spiking ». Cette technique consiste à introduire dans chacun des échantillons analysés une quantité connue d'un ADN exogène (par exemple celui d'un phage non présent dans l'écosystème étudié) et d'utiliser cette information pour calculer le facteur de correspondance entre la proportion de lectures obtenues après séquençage et la concentration théorique de cet ADN (Shkoporov et al. 2019). Le facteur obtenu est ensuite appliqué aux autres phages pour estimer leurs concentrations dans l'échantillon d'origine. Le spiking est aussi régulièrement utilisé afin de connaître l'efficacité d'une méthode d'extraction (Alanin et al. 2021), donnée qui n'a pas été testée dans ce projet .

En plus d'avoir accès au nombre de particules virales, il pourrait être intéressant d'étudier leur viabilité (c'est-à-dire capacité à infecter) à la surface du fromage et dans l'environnement de production. En effet, la viabilité des virions décroît progressivement dans le milieu extérieur. Par exemple, il a été estimé que dans le lac du Bourget, en moyenne 30% des particules virales produites sont perdues quotidiennement (Thomas et al. 2011). De même, la concentration des

phages T4 et P10 décroît d'environ 5 logs après 30 jours dans de l'eau lacustre non-stérilisée (Wiggins et Alexander 1985). Calculer la demi-vie des particules virales dans l'environnement fromager afin de connaître le ratio de particules actives/non-viables permettrait ainsi d'obtenir une information supplémentaire pour évaluer de manière plus précise l'impact écologique des phages sur l'écosystème fromager. En effet, les approches utilisées dans ce travail de thèse, en particulier la métagénomique virale, ne permettent pas de différencier les particules viables de celles qui ne sont plus capables d'infecter leur hôte.

Dans les différents travaux présentés (**Chapitres 2 et 3**), le protocole utilisé pour la purification des fractions virales à partir des échantillons de surface du fromage intègre une étape de filtration sur filtre en polyéthersulfone (PES) de porosité 0,22 μm , qui permet de séparer les particules virales des microorganismes cellulaires. Des travaux indiquent pourtant que l'utilisation de filtres de cette porosité peut conduire à l'élimination d'une partie des virus de l'échantillon (Martínez et al. 2014). L'effet de la porosité des filtres sur la composition de la fraction virale récupérée à partir d'aliments fermentés est actuellement à l'étude dans notre laboratoire. Ces données pourront permettre d'évaluer retrospectivement si un biais a été introduit lors de notre analyse par métagénomique virale.

L'approche de métagénomique virale a été utilisée afin d'explorer la composition et la dynamique de la communauté virale de la surface du fromage sans a priori (**Chapitre 3**). Cette approche génère une table d'abondance contenant de nombreux contigs, plus ou moins complets selon la profondeur de séquençage employée et la qualité de l'assemblage des lectures. Cependant, il arrive que des contigs ne diffèrent que de quelques bases. Dans certains cas, ces variations reflètent réellement plusieurs sous-populations d'une même espèce/souche de phage. Mais il arrive également que ces différences soient artificielles et liées à des erreurs de séquençage ou un mauvais assemblage des lectures (production de séquences chimériques). Les erreurs de séquençage, bien que peu fréquentes avec la technologie Illumina (fidélité >99% (Quail et al. 2012)), sont de trois types : insertions, délétions et substitutions (Marinier et al. 2015; Vincent et al. 2017). Au moment de faire le consensus des séquences, l'assembleur conserve parfois l'information contenue dans une lecture erronée. Il est aussi possible, en particulier lorsque des séquences répétées sont présentes dans les données, que l'assembleur associe des lectures provenant de génomes de phages différents (séquences chimériques) sur un même contig. Cette génération de signal erronée a pour effet indésirable

d'augmenter artificiellement la diversité des contigs détectés dans les échantillons et peut conduire à de mauvaises interprétations biologiques. Pour tenter de limiter ce problème, il est possible de clusteriser les contigs qui présentent une forte homologie de séquence (technique utilisée dans le **Chapitre 3**). Pour le métavirome de fromage que nous avons produit, le nombre de contigs (4222) reste malgré tout très élevé et semble bien supérieur à la diversité des phages réellement présente dans les échantillons. Les méthodes d'analyse des métaviromes ne sont pas encore optimales, et le point soulevé ici devra faire l'objet d'améliorations dans le futur. Dans les études métagénomiques classiques, une étape de « binning » est souvent ajoutée au pipeline d'analyse. Elle a pour objectif d'attribuer des fragments séquencés et assemblés (contigs) à des groupes, appelés « bin », sensés provenir d'un même groupe taxonomique (espèce, genre, famille, etc.) (Sedlar et al. 2017). Le binning peut être taxonomie-dépendant ou indépendant. Dans le premier cas, il s'appuie sur les homologies de séquence avec les génomes contenus dans une base de données de référence. Dans le second, il s'appuie uniquement sur les caractéristiques issues des séquences : composition en nucléotides, abondance, ou une approche prenant ces deux informations en compte (approche hybride). Ces bins servent ensuite à produire des MAGs, pour Metagenome-Assembled Genomes, ou des vMAGs, pour « viral » MAGs. Dans les rares études qui utilisent le binning pour produire des vMAGs, seuls les virus possédants les plus grands génomes sont considérés (Kieft et Anantharaman 2022). De nouveaux outils bioinformatiques sont actuellement en train d'être développés pour intégrer ce type d'approches et permettre de mieux exploiter les données des métaviromes, comme vRhyme (Kieft et al. 2021).

Les analyses des génomes complets des cinq phages isolés au cours de ce travail ainsi que des métaviromes générés montrent que les séquences génomiques de phages infectant des bactéries laitières autres que des LAB (*Lactococcus*, *Leuconostoc*, etc.) sont sous-représentées dans les bases de données actuelles. Concernant les génomes, leur annotation fonctionnelle a également montré qu'il restait de nombreux gènes dont la fonction est actuellement inconnue. Afin de mieux comprendre le fonctionnement de l'écosystème fromager, il faudrait donc poursuivre l'effort d'exploration des communautés virales de fromages affinés. Cela pourrait passer par la création d'une collection importante de phages représentatifs de cet écosystème. Au-delà du simple intérêt scientifique de mieux connaître l'identité des bactériophages et de leurs hôtes bactériens, cette collection pourrait également être utilisée par les producteurs de

ferments d'affinage pour tester la résistance aux phages de leurs souches avant de les mettre sur le marché, comme ils le font déjà en routine pour la sélection des ferments lactiques. Par ailleurs, l'accès aux séquences génomiques de ces phages pourrait aussi permettre de dessiner des amorces spécifiques et ainsi développer des outils de détection rapides pour les professionnels du secteur. De tels outils diagnostics sont d'ailleurs déjà commercialisés pour détecter et quantifier certains phages de ferments lactiques (DSM 2021). Sur la base des génomes déjà disponibles et de ceux produits au cours de cette thèse, une méthode de PCR quantitative pourrait par exemple d'ores et déjà être mise en place pour mesurer rapidement le niveau de contamination en phages ciblant les bactéries d'affinage *Propionibacterium freudenreichii*, *Brevibacterium aurantiacum*, *Leuconostoc falkenbergense*, *Glutamicibacter arilaitensis* et *Psychrobacter aquimaris* dans des produits laitiers ou leur environnement de production.

A l'échelle de l'écosystème, la prédation par les phages provoque la réduction de la densité des populations sensibles. Cela a pour effet d'avantager les autres microorganismes partageant la même niche écologique, qui bénéficient alors d'une plus faible compétition et peuvent par conséquent se développer plus facilement. Néanmoins, les interactions microbiennes au sein du fromage sont complexes, et surtout ne se limitent pas à la compétition (Irlinger et Mounier 2009; Mayo et al. 2021). Ainsi, dans le cas de certaines interactions positives, comme le mutualisme, l'élimination de l'un des deux protagonistes suite à une attaque phagique pourrait entraîner le moins bon développement du second et finalement déstabiliser l'écosystème dans son ensemble. Cela a par exemple été montré chez des souris gnotobiotiques où l'administration de phages virulents infectant *E. coli* et *Clostridium sporogenes* a provoqué des changements de concentrations au sein de populations non-sensibles, qu'elles soient initialement peu (*Bacteroides vulgatus*, *Parabacteroides distasonis* et *Proteus mirabilis*) ou très abondantes (*Bacteroides fragilis* et *Akkermansia muciniphila*) (Hsu et al. 2019). Ce constat est une des raisons pour lesquelles l'approche d'écologie synthétique, qui consiste à étudier un modèle simplifié pour mieux comprendre un écosystème complexe, serait intéressante à mettre en œuvre pour poursuivre ce travail (De Roy et al. 2014). En effet, elle permettrait de mesurer précisément l'impact de la présence de certains phages sur les successions microbiennes qui s'opèrent durant la fabrication du fromage, en prenant en compte une partie des interactions existantes dans le produit réel.

Au niveau industriel, le recours à la pasteurisation et à l'inoculation de ferments lactiques qui acidifient rapidement le lait visent entre autres à éviter le développement de bactéries pathogènes, comme *Listeria monocytogenes*. Cette pratique a en contrepartie tendance à réduire la diversité bactérienne présente au moment de l'affinage, ce qui impacte négativement la richesse organoleptique des fromages affinés (Egger et al. 2021). Une stratégie innovante pourrait consister à contrôler les pathogènes alimentaires les plus courants par l'ajout de phages virulents spécifiques dans le lait ou le caillé. Cela permettrait de maintenir le microbiote du lait cru dans le procédé de fabrication fromagère, qui possède un potentiel aromatique intéressant, tout en maîtrisant la qualité sanitaire des produits. Contrairement aux Etats-Unis, il n'y a pour le moment pas de cadre réglementaire concernant l'utilisation des phages pour la bioprotection des aliments en Europe. En France, l'ANSES a rendu une évaluation sur l'efficacité du phage LISTEX P100 (ANSES 2014). Une des principales craintes associées aux phages dans ce contexte est leur capacité à transférer des gènes aux bactéries, car ils peuvent conférer à leur hôte une résistance à certains antibiotiques, ou le rendre pathogène (Haaber et al. 2017). L'importance de ce phénomène de transfert de résistance est à relativiser dans le sens où il a été montré que les phages dans les viromes portent rarement des gènes de résistance (Enault et al. 2017). La bioprotection par les phages pourrait également être envisagée pour allonger la date limite de consommation de certains produits alimentaires. En effet, certains microorganismes responsables d'altération sont de nature bactérienne et il pourrait être tout à fait pertinent de considérer l'utilisation de phages afin d'empêcher, ou de retarder leur développement. Cela illustre bien le paradoxe de l'utilisation des phages dans le domaine alimentaire, car si leur présence est redoutée dans des circonstances particulières, ils peuvent aussi constituer un levier pour améliorer la qualité des produits alimentaires (de Melo et al. 2018; O'Sullivan et al. 2019).

A l'issue de ce travail, les communautés virales de la surface du fromage sont mieux connues. Les connaissances acquises lors de ce projet viennent compléter les données obtenues précédemment sur les autres acteurs biotiques de l'écosystème fromager. Il reste à mieux comprendre les effets de ces parasites sur la dynamique des autres membres de l'écosystème pour pouvoir à terme maîtriser leur impact, positif ou négatif, sur la qualité des fromages.

Bibliographie

Agudelo, R.A., Gauthier, S.F., Pouliot, Y., Marin, J. et Savoie, L. 2004. Kinetics of peptide fraction release during in vitro digestion of casein. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84(4), p. 325-332. doi: 10.1002/jsfa.1662.

Alanin, K.W.S., Junco, L.M.F., Jørgensen, J.B., Nielsen, T.K., Rasmussen, M.A., Kot, W. et Hansen, L.H. 2021. Metaviromes Reveal the Dynamics of Pseudomonas Host-Specific Phages Cultured and Uncultured by Plaque Assay. *Viruses* 13(6), p. 959. doi: 10.3390/v13060959.

Albenzio, M. et al. 2001. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. *International Journal of Food Microbiology* 67(1-2), p. 35-48. doi: 10.1016/s0168-1605(00)00533-x.

Almena-Aliste, M. et Mietton, B. 2014. Cheese Classification, Characterization, and Categorization: A Global Perspective. *Microbiology Spectrum* 2(1), p. CM-0003-2012. doi: 10.1128/microbiolspec.CM-0003-2012.

ANSES. 2014. AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à l'utilisation des phages dans les denrées alimentaires d'origine animale pour lutter contre les Listeria. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2013sa0111.pdf>.

ANSES. 2018. Attribution des sources des maladies infectieuses d'origine alimentaire. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2015SA0162Ra-2.pdf>.

AOP-CNAOL. 2022a. *Chiffres clés 2021 - Produits laitiers AOP et IGP*. Disponible sur: <https://presse.filiere-laitiere.fr/assets/chiffres-cles-2021-produits-laitiers-aop-et-igp-65b4-ef05e.html?lang=fr> [Consulté le: 8 novembre 2022].

AOP-CNAOL. 2022b. *Chiffres clés des fromages au lait cru*. Disponible sur: <https://presse.filiere-laitiere.fr/photos/chiffres-cles-des-fromages-au-lait-cru-2022-35ed-ef05e.html?lang=fr> [Consulté le: 18 août 2022].

Arfi, K., Landaud, S. et Bonnarne, P. 2006. Evidence for Distinct l-Methionine Catabolic Pathways in the Yeast *Geotrichum candidum* and the Bacterium *Brevibacterium linens*. *Applied and Environmental Microbiology* 72(3), p. 2155-2162. doi: 10.1128/AEM.72.3.2155-2162.2006.

Arfi, K., Spinnler, H.E., Tache, R. et Bonnarne, P. 2002. Production of volatile compounds by cheese-ripening yeasts: requirement for a methanethiol donor for S-methyl thioacetate synthesis by *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58(4), p. 503-510. doi: 10.1007/s00253-001-0925-0.

Atamer, Z. 2022. An extraordinary dairy phage and its properties: Occurrence, growth, inactivation, survival. *International Dairy Journal* 129, p. 105336. doi: 10.1016/j.idairyj.2022.105336.

Atamer, Z., Ali, Y., Neve, H., Heller, K.J. et Hinrichs, J. 2011. Thermal resistance of bacteriophages attacking flavour-producing dairy *Leuconostoc* starter cultures. *International Dairy Journal* 21(5), p. 327-334. doi: 10.1016/j.idairyj.2010.11.005.

- Bae, I., Park, J.-H., Choi, H.-Y. et Jung, H.-K. 2017. Emerging Innovations to Reduce the Salt Content in Cheese; Effects of Salt on Flavor, Texture, and Shelf Life of Cheese; and Current Salt Usage: A Review. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 37(6), p. 793-798. doi: 10.5851/kosfa.2017.37.6.793.
- Balogh, Z. et al. 2010. Tick-borne encephalitis outbreak in Hungary due to consumption of raw goat milk. *Journal of Virological Methods* 163(2), p. 481-485. doi: 10.1016/j.jviromet.2009.10.003.
- Bari, M.L. et Yeasmin, S. 2022. Microbes Culture Methods. In: Rezaei, N. éd. *Encyclopedia of Infection and Immunity*. Oxford: Elsevier, p. 77-98. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128187319001282> [Consulté le: 21 novembre 2022].
- Barrangou, R. et al. 2007. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* 315(5819), p. 1709-1712. doi: 10.1126/science.1138140.
- Bauer, R. et Dicks, L.M.T. 2004. Control of Malolactic Fermentation in Wine. A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 25(2), p. 74-88. doi: 10.21548/25-2-2141.
- Bebeacua, C. et al. 2013. Structure, Adsorption to Host, and Infection Mechanism of Virulent Lactococcal Phage p2. *Journal of Virology* 87(22), p. 12302-12312. doi: 10.1128/JVI.02033-13.
- Benler, S. et Koonin, E.V. 2021. Fishing for phages in metagenomes: what do we catch, what do we miss? *Current Opinion in Virology* 49, p. 142-150. doi: 10.1016/j.coviro.2021.05.008.
- Bernheim, A. et Sorek, R. 2020. The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource. *Nature Reviews. Microbiology* 18(2), p. 113-119. doi: 10.1038/s41579-019-0278-2.
- Bertozzi Silva, J., Storms, Z. et Sauvageau, D. 2016. Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiology Letters* 363(4), p. fnw002. doi: 10.1093/femsle/fnw002.
- Beuvier, E., Berthaud, K., Cegarra, S., Dasen, A., Pochet, S., Buchin, S. et Duboz, G. 1997. Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. *International Dairy Journal* 7(5), p. 311-323. doi: 10.1016/S0958-6946(97)00015-0.
- Bhowmik, T. et Marth, E.H. 1990. Rote of Micrococcus and Pediococcus Species in Cheese Ripening: A Review1. p. 8.
- Bigwood, T., Hudson, J.A. et Billington, C. 2009. Influence of host and bacteriophage concentrations on the inactivation of food-borne pathogenic bacteria by two phages. *FEMS Microbiology Letters* 291(1), p. 59-64. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01435.x.
- Bintsis, T. et Bintsis, T. 2018. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology* 4(4), p. 665-684. doi: 10.3934/microbiol.2018.4.665.

- Birch, J. 2016. Natural selection and the maximization of fitness. *Biological Reviews* 91(3), p. 712-727. doi: 10.1111/brv.12190.
- BIS Research. 2019. *Global Fermented Food and Ingredients Market - Analysis and Forecast (2018-2023): Focus on Food Type (Fermented Dairy, Fermented Beverages, Fermented Vegetables), Ingredient Type (Amino Acid, Organic Acid, Industrial Enzyme), and Distribution Channel*. Disponible sur: <https://bisresearch.com/industry-report/fermented-food-ingredients-market.html> [Consulté le: 14 décembre 2022].
- Blackwell, J.H. 1976. Survival of Foot-and-Mouth Disease Virus in Cheese¹. *Journal of Dairy Science* 59(9), p. 1574-1579. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(76)84407-4.
- Blasdel, B.G. et Abedon, S.T. 2013. Superinfection Immunity. In: Maloy, S. et Hughes, K. éd. *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*. San Diego: Academic Press, p. 584-586. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123749840014911> [Consulté le: 13 novembre 2022].
- Bobay, L.-M., Touchon, M. et Rocha, E.P.C. 2014. Pervasive domestication of defective prophages by bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(33), p. 12127-12132. doi: 10.1073/pnas.1405336111.
- Bockelmann, W. et Hoppe-Seyler, T. 2001. The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. *International Dairy Journal* 11(4), p. 307-314. doi: 10.1016/S0958-6946(01)00060-7.
- Bokulich, N.A. et Mills, D.A. 2013. Facility-Specific "House" Microbiome Drives Microbial Landscapes of Artisan Cheesemaking Plants. *Applied and Environmental Microbiology* 79(17), p. 5214-5223. doi: 10.1128/AEM.00934-13.
- Bondy-Denomy, J., Qian, J., Westra, E.R., Buckling, A., Guttman, D.S., Davidson, A.R. et Maxwell, K.L. 2016. Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *The ISME journal* 10(12), p. 2854-2866. doi: 10.1038/ismej.2016.79.
- Bonham, K.S., Wolfe, B.E. et Dutton, R.J. 2017. Extensive horizontal gene transfer in cheese-associated bacteria. Handley, K. éd. *eLife* 6, p. e22144. doi: 10.7554/eLife.22144.
- Bonnarme, P., Psoni, L. et Spinnler, H.E. 2000. Diversity of l-Methionine Catabolism Pathways in Cheese-Ripening Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66(12), p. 5514-5517. doi: 10.1128/AEM.66.12.5514-5517.2000.
- Bouton, Y., Guyot, P., Vacheyrou, M., Normand, A.-C., Piarroux, R. et Beuvier, E. 2007. Etude des flux bactériens dans les étables de production laitière de Franche-Comté: exemple des LHF. Disponible sur: <https://hal.inrae.fr/hal-02758083> [Consulté le: 18 novembre 2022].
- Breitbart, M. et al. 2002. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(22), p. 14250-14255. doi: 10.1073/pnas.202488399.
- Breitbart, M. 2012. Marine Viruses: Truth or Dare. *Annual Review of Marine Science* 4(1), p. 425-448. doi: 10.1146/annurev-marine-120709-142805.

Breitbart, M. et Rohwer, F. 2005. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends in Microbiology* 13(6), p. 278-284. doi: 10.1016/j.tim.2005.04.003.

Brennan, N.M., Ward, A.C., Beresford, T.P., Fox, P.F., Goodfellow, M. et Cogan, T.M. 2002. Biodiversity of the Bacterial Flora on the Surface of a Smear Cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 68(2), p. 820-830. doi: 10.1128/AEM.68.2.820-830.2002.

Brussaard, C.P.D. 2009. Enumeration of Bacteriophages Using Flow Cytometry. In: Clokie, M. R. J. et Kropinski, A. M. éd. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*. Methods in Molecular Biology™. Totowa, NJ: Humana Press, p. 97-111. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_11 [Consulté le: 28 septembre 2022].

Busse, H.-J. 2016. 2016. Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter* sensu lato, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66(1), p. 9-37. doi: 10.1099/ijsem.0.000702.

Callanan, J., Stockdale, S.R., Shkoporov, A., Draper, L.A., Ross, R.P. et Hill, C. 2018. RNA Phage Biology in a Metagenomic Era. *Viruses* 10(7), p. 386. doi: 10.3390/v10070386.

Callanan, J., Stockdale, S.R., Shkoporov, A., Draper, L.A., Ross, R.P. et Hill, C. 2021. Biases in Viral Metagenomics-Based Detection, Cataloguing and Quantification of Bacteriophage Genomes in Human Faeces, a Review. *Microorganisms* 9(3), p. 524. doi: 10.3390/microorganisms9030524.

Callon, C., Delbès, C., Duthoit, F. et Montel, M.-C. 2006. Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Systematic and Applied Microbiology* 29(2), p. 172-180. doi: 10.1016/j.syapm.2005.07.008.

Callon, C., Millet, L. et Montel, M.-C. 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *The Journal of Dairy Research* 71(2), p. 231-244. doi: 10.1017/s0022029904000159.

Caplice, E. et Fitzgerald, G.F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50(1), p. 131-149. doi: 10.1016/S0168-1605(99)00082-3.

Casjens, S. 2003. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Molecular Microbiology* 49(2), p. 277-300. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03580.x.

del Castillo-Lozano, M.L., Mansour, S., Tâche, R., Bonnarme, P. et Landaud, S. 2008. The effect of cysteine on production of volatile sulphur compounds by cheese-ripening bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 122(3), p. 321-327. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.025.

Chaïb, A., Decossas, M., Philippe, C., Claisse, O., Lambert, O. et Le Marrec, C. 2020. *Isolation and CryoTEM of Phages Infecting Bacterial Wine Spoilers*. doi: 10.21769/BioProtoc.3801.

- Chamba, J.-F. et Perreard, É. 2002. Contribution of propionic acid bacteria to lipolysis of Emmental cheese. *Le Lait* 82(1), p. 33-44. doi: 10.1051/lait:2001003.
- Chen, L.-S., Ma, Y., Maubois, J.-L., Chen, L.-J., Liu, Q.-H. et Guo, J.-P. 2010. Identification of yeasts from raw milk and selection for some specific antioxidant properties. *International Journal of Dairy Technology* 63(1), p. 47-54. doi: 10.1111/j.1471-0307.2009.00548.x.
- Cheng, L. et al. 2018. Complete genomic sequences of *Propionibacterium freudenreichii* phages from Swiss cheese reveal greater diversity than *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) acnes phages. *BMC Microbiology* 18(1), p. 19. doi: 10.1186/s12866-018-1159-y.
- Cheong, E.Y.L. et al. 2014. Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control* 46, p. 91-97. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.05.011.
- Chevallereau, A., Pons, B.J., van Houte, S. et Westra, E.R. 2022. Interactions between bacterial and phage communities in natural environments. *Nature Reviews Microbiology* 20(1), p. 49-62. doi: 10.1038/s41579-021-00602-y.
- Choi, J. et al. 2020. Microbial communities of a variety of cheeses and comparison between core and rind region of cheeses. *Journal of Dairy Science* 103(5), p. 4026-4042. doi: 10.3168/jds.2019-17455.
- Chopin, M.-C., Chopin, A. et Bidnenko, E. 2005. Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme. *Current Opinion in Microbiology* 8(4), p. 473-479. doi: 10.1016/j.mib.2005.06.006.
- Chopin, M.-C., Rouault, A., Ehrlich, S.D. et Gautier, M. 2002. Filamentous Phage Active on the Gram-Positive Bacterium *Propionibacterium freudenreichii*. *Journal of Bacteriology* 184(7), p. 2030-2033. doi: 10.1128/JB.184.7.2030-2033.2002.
- Cleary, J.L., Kolachina, S., Wolfe, B.E. et Sanchez, L.M. 2018. Coproporphyrin III Produced by the Bacterium *Glutamicibacter arilaitensis* Binds Zinc and Is Upregulated by Fungi in Cheese Rinds. *mSystems* 3(4), p. e00036-18. doi: 10.1128/mSystems.00036-18.
- Cleere, M. 2017. *Pigment biosynthesis genes in the blue cheese fungus Penicillium roqueforti*. Disponible sur: <http://eprints.nottingham.ac.uk/40408/> [Consulté le: 9 novembre 2022].
- Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C. et Comi, G. 2002. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal* 12(5), p. 407-411. doi: 10.1016/S0958-6946(02)00023-7.
- Codex Alimentarius Commission. 2007. *Report of the thirtieth session / Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Alimentarius Commission*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations [u.a.].
- Coelho, M.C., Malcata, F.X. et Silva, C.C.G. 2022. Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses: From Starter Cultures to Probiotic Functions. *Foods* 11(15), p. 2276. doi: 10.3390/foods11152276.

Cogan, T.M. et al. 2014. Biodiversity of the Surface Microbial Consortia from Limburger, Reblochon, Livarot, Tilsit, and Gubbeen Cheeses. *Microbiology Spectrum* 2(1), p. 2.1.22. doi: 10.1128/microbiolspec.CM-0010-2012.

Colak, H., Hampikyan, H., Bingol, E.B. et Ulusoy, B. 2007. Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Tulum cheese. *Food Control* 18(5), p. 576-579. doi: 10.1016/j.foodcont.2006.02.004.

Colombo, S., Arioli, S., Gargari, G., Neri, E., Della Scala, G. et Mora, D. 2018. Characterization of airborne viromes in cheese production plants. *Journal of Applied Microbiology* 125(5), p. 1444-1454. doi: 10.1111/jam.14046.

Commission de l'Union Européenne. 2005. Règlement (CE) n°2073/2005.

Conley, M.P. et Wood, W.B. 1975. Bacteriophage T4 whiskers: a rudimentary environment-sensing device. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(9), p. 3701-3705.

Conseil de l'Union Européenne. 2007. RÈGLEMENT (CE) No 1234/2007. Disponible sur: http://publications.europa.eu/resource/cellar/53444a17-a60f-491a-8786-4ae59543359d.0010.01/DOC_1.

Corsetti, A., Rossi, J. et Gobbetti, M. 2001. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 69(1), p. 1-10. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00567-0.

Cotter, P.D. et Beresford, T.P. 2017. Chapter 15 - Microbiome Changes During Ripening. In: McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D., et Everett, D. W. éd. *Cheese (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press, p. 389-409. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124170124000156> [Consulté le: 30 août 2022].

Course Hero. 2022. *The Viral Life Cycle*. Disponible sur: <https://www.coursehero.com/study-guides/microbiology/the-viral-life-cycle/> [Consulté le: 16 novembre 2022].

Cremonesi, P. et al. 2007. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. *Letters in Applied Microbiology* 45(6), p. 586-591. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02231.x.

De Filippis, F., Genovese, A., Ferranti, P., Gilbert, J.A. et Ercolini, D. 2016. Metatranscriptomics reveals temperature-driven functional changes in microbiome impacting cheese maturation rate. *Scientific Reports* 6(1), p. 21871. doi: 10.1038/srep21871.

De Paepe, M., Tournier, L., Moncaut, E., Son, O., Langella, P. et Petit, M.-A. 2016. Carriage of λ Latent Virus Is Costly for Its Bacterial Host due to Frequent Reactivation in Monoxenic Mouse Intestine. *PLoS Genetics* 12(2), p. e1005861. doi: 10.1371/journal.pgen.1005861.

De Roy, K., Marzorati, M., Van den Abbeele, P., Van de Wiele, T. et Boon, N. 2014. Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities. *Environmental Microbiology* 16(6), p. 1472-1481. doi: 10.1111/1462-2920.12343.

Décret n°2007-628 du 27 avril 2007 relatif aux fromages et spécialités fromagères. 2007

Deetae, P., Bonnarme, P., Spinnler, H.E. et Helinck, S. 2007. Production of volatile aroma compounds by bacterial strains isolated from different surface-ripened French cheeses. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76(5), p. 1161-1171. doi: 10.1007/s00253-007-1095-5.

Deetae, P., Spinnler, H.-E., Bonnarme, P. et Helinck, S. 2009. Growth and aroma contribution of *Microbacterium foliorum*, *Proteus vulgaris* and *Psychrobacter* sp. during ripening in a cheese model medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82(1), p. 169-177. doi: 10.1007/s00253-008-1805-7.

Del Rio, B. et al. 2019. Enterococcus faecalis Bacteriophage 156 Is an Effective Biotechnological Tool for Reducing the Presence of Tyramine and Putrescine in an Experimental Cheese Model. *Frontiers in Microbiology* 10, p. 566. doi: 10.3389/fmicb.2019.00566.

Delcenserie, V. et al. 2014. Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. *Journal of Dairy Science* 97(10), p. 6046-6056. doi: 10.3168/jds.2014-8225.

Delfosse, C. 2012. La diffusion mondiale de la consommation de fromage, de l'ingrédient de pizza au produit de terroir. *Pour* 215-216(3-4), p. 123-129. doi: 10.3917/pour.215.0123.

Dennehy, J.J. et Abedon, S.T. 2021. Phage Infection and Lysis. In: Harper, D. R., Abedon, S. T., Burrowes, B. H., et McConville, M. L. éd. *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy*. Cham: Springer International Publishing, p. 341-383. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-319-41986-2_53 [Consulté le: 13 septembre 2022].

Desmaures, N., Bora, N. et Ward, A.C. 2015. Smear Ripened Cheeses. In: Bora, N., Dodd, C., et Desmaures, N. éd. *Diversity, Dynamics and Functional Role of Actinomycetes on European Smear Ripened Cheeses*. Cham: Springer International Publishing, p. 1-18. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-10464-5_1 [Consulté le: 2 novembre 2022].

Deveau, H., Garneau, J.E. et Moineau, S. 2010. CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions. *Annual Review of Microbiology* 64(1), p. 475-493. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134123.

Deveau, H., Labrie, S.J., Chopin, M.-C. et Moineau, S. 2006. Biodiversity and Classification of Lactococcal Phages. *Applied and Environmental Microbiology* 72(6), p. 4338-4346. doi: 10.1128/AEM.02517-05.

DGCCRF. 2021. *Signes officiels de la qualité des produits alimentaires*. Disponible sur: <https://www.economie.gouv.fr/dgccrf/Publications/Vie-pratique/Fiches-pratiques/Signe-de-qualite> [Consulté le: 18 août 2022].

D'Herelle, F. 1917. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. *Research in Microbiology* 158(7), p. 553-554. doi: 10.1016/j.resmic.2007.07.005.

Didienne, R., Defargues, C., Callon, C., Meylheuc, T., Hulin, S. et Montel, M.-C. 2012. Characteristics of microbial biofilm on wooden vats ('gerles') in PDO Salers cheese. *International Journal of Food Microbiology* 156(2), p. 91-101. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.007.

Doyle, M.E. et Glass, K.A. 2010. Sodium Reduction and Its Effect on Food Safety, Food Quality, and Human Health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9(1), p. 44-56. doi: 10.1111/j.1541-4337.2009.00096.x.

DSM. 2021. *DSM sets new dairy standards with unique one-hour phage detection technology and digital phage management platform | DSM Food & Beverage*. Disponible sur: https://www.dsm.com/food-beverage/en_US/insights/insights/innovation/2021-10-07-dsm-sets-new-dairy-standards-with-unique-one-hour-phage-detection-technology-and-digital-phage-management-platform.html [Consulté le: 10 décembre 2022].

Dubrovin, E.V., Voloshin, A.G., Kraevsky, S.V., Ignatyuk, T.E., Abramchuk, S.S., Yaminsky, I.V. et Ignatov, S.G. 2008. Atomic Force Microscopy Investigation of Phage Infection of Bacteria. *Langmuir* 24(22), p. 13068-13074. doi: 10.1021/la8022612.

Dugat-Bony, E., Garnier, L., Denonfoux, J., Ferreira, S., Sarthou, A.-S., Bonnarme, P. et Irlinger, F. 2016a. Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *International Journal of Food Microbiology* 238, p. 265-273. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.026.

Dugat-Bony, E., Lossouarn, J., De Paepe, M., Sarthou, A.-S., Fedala, Y., Petit, M.-A. et Chaillou, S. 2020. Viral metagenomic analysis of the cheese surface: A comparative study of rapid procedures for extracting viral particles. *Food Microbiology* 85, p. 103278. doi: 10.1016/j.fm.2019.103278.

Dugat-Bony, E., Sarthou, A.-S., Perello, M.-C., de Revel, G., Bonnarme, P. et Helinck, S. 2016b. The effect of reduced sodium chloride content on the microbiological and biochemical properties of a soft surface-ripened cheese. *Journal of Dairy Science* 99(4), p. 2502-2511. doi: 10.3168/jds.2015-10502.

Dupuis, M.-È., Villion, M., Magadán, A.H. et Moineau, S. 2013. CRISPR-Cas and restriction-modification systems are compatible and increase phage resistance. *Nature Communications* 4(1), p. 2087. doi: 10.1038/ncomms3087.

Düsterhöft, E.-M., Engels, W. et Huppertz, T. 2017. Chapter 34 - Gouda and Related Cheeses. In: McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D., et Everett, D. W. éd. *Cheese (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press, p. 865-888. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012417012400034X> [Consulté le: 19 novembre 2022].

Dutilh, B.E. et al. 2021. Perspective on taxonomic classification of uncultivated viruses. *Current Opinion in Virology* 51, p. 207-215. doi: 10.1016/j.coviro.2021.10.011.

- Egger, L. et al. 2021. Higher microbial diversity in raw than in pasteurized milk Raclette-type cheese enhances peptide and metabolite diversity after in vitro digestion. *Food Chemistry* 340, p. 128154. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128154.
- El Haddad, L., Roy, J.-P., Khalil, G.E., St-Gelais, D., Champagne, C.P., Labrie, S. et Moineau, S. 2016. Efficacy of two *Staphylococcus aureus* phage cocktails in cheese production. *International Journal of Food Microbiology* 217, p. 7-13. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.001.
- Enault, F., Briet, A., Bouteille, L., Roux, S., Sullivan, M.B. et Petit, M.-A. 2017. Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *The ISME Journal* 11(1), p. 237-247. doi: 10.1038/ismej.2016.90.
- Ercolini, D. 2013. High-Throughput Sequencing and Metagenomics: Moving Forward in the Culture-Independent Analysis of Food Microbial Ecology. *Applied and Environmental Microbiology* 79(10), p. 3148-3155. doi: 10.1128/AEM.00256-13.
- Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I. et Villani, F. 2009. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology* 26(2), p. 228-231. doi: 10.1016/j.fm.2008.09.005.
- Erkus, O. et al. 2013. Multifactorial diversity sustains microbial community stability. *The ISME Journal* 7(11), p. 2126-2136. doi: 10.1038/ismej.2013.108.
- Espié, E., Vaillant, V., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Martin-Schaller, R., Valk, H.D. et Vernozy-Rozand, C. 2006. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiology & Infection* 134(1), p. 143-146. doi: 10.1017/S0950268805004887.
- Faust, K. et Raes, J. 2012. Microbial interactions: from networks to models. *Nature Reviews Microbiology* 10(8), p. 538-550. doi: 10.1038/nrmicro2832.
- FDA. 2022. *CFR - Code of Federal Regulations Title 21*. Disponible sur: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=133&showFR=1> [Consulté le: 20 octobre 2022].
- Fernández, L., Escobedo, S., Gutiérrez, D., Portilla, S., Martínez, B., García, P. et Rodríguez, A. 2017. Bacteriophages in the Dairy Environment: From Enemies to Allies. *Antibiotics* 6(4), p. 27. doi: 10.3390/antibiotics6040027.
- Fernández, L., Rodríguez, A. et García, P. 2018. Phage or foe: an insight into the impact of viral predation on microbial communities. *The ISME Journal* 12(5), p. 1171-1179. doi: 10.1038/s41396-018-0049-5.
- Fernández, M., Linares, D.M., Rodríguez, A. et Alvarez, M.A. 2007. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73(6), p. 1400-1406. doi: 10.1007/s00253-006-0596-y.
- Ferreira, A.D. et Viljoen, B.C. 2003. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology* 86(1), p. 131-140. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00252-6.

Feurer, C., Irlinger, F., Spinnler, H. e., Glaser, P. et Vallaey, T. 2004a. Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced vs a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods. *Journal of Applied Microbiology* 97(3), p. 546-556. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02333.x.

Feurer, C., Vallaey, T., Corrieu, G. et Irlinger, F. 2004b. Does Smearing Inoculum Reflect the Bacterial Composition of the Smear at the End of the Ripening of a French Soft, Red-Smear Cheese? *Journal of Dairy Science* 87(10), p. 3189-3197. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73454-2.

Filipiak, M., Łoś, J.M. et Łoś, M. 2020. Efficiency of induction of Shiga-toxin lambdoid prophages in *Escherichia coli* due to oxidative and antibiotic stress depends on the combination of prophage and the bacterial strain. *Journal of Applied Genetics* 61(1), p. 131-140. doi: 10.1007/s13353-019-00525-8.

Fineran, P.C., Blower, T.R., Foulds, I.J., Humphreys, D.P., Lilley, K.S. et Salmond, G.P.C. 2009. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(3), p. 894-899. doi: 10.1073/pnas.0808832106.

Foroutan, A. et al. 2019. Chemical Composition of Commercial Cow's Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67(17), p. 4897-4914. doi: 10.1021/acs.jafc.9b00204.

Forterre, P. 2013. The virocell concept and environmental microbiology. *The ISME Journal* 7(2), p. 233-236. doi: 10.1038/ismej.2012.110.

Fox, P.F., Cogan, T.M. et Guinee, T.P. 2017a. Chapter 25 - Factors That Affect the Quality of Cheese. In: McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D., et Everett, D. W. éd. *Cheese (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press, p. 617-641. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124170124000259> [Consulté le: 21 novembre 2022].

Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. et McSweeney, P.L.H. 2017b. Microbiology of Cheese Ripening. In: *Fundamentals of Cheese Science*. Boston, MA: Springer US, p. 333-390. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4899-7681-9_11 [Consulté le: 6 septembre 2022].

Fox, P.F. et McSweeney, P.L.H. 2017. Chapter 1 - Cheese: An Overview. In: McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D., et Everett, D. W. éd. *Cheese (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press, p. 5-21. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124170124000016> [Consulté le: 19 octobre 2022].

Fox, P.F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P.L.H. et O'Mahony, J.A. 2015. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Cham: Springer International Publishing. Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-14892-2> [Consulté le: 20 octobre 2022].

FranceAgriMer. 2016. *La filière lait de vache biologique en France*. Disponible sur: <https://www.franceagrimer.fr/filiere-lait/Actualites/2016/ETUDE-La-filiere-lait-de-vache-biologique-en-France> [Consulté le: 22 décembre 2022].

FranceAgriMer. 2022. *La consommation de produits laitiers en 2021*. Disponible sur: <https://www.franceagrimer.fr/Actualite/Filieres/Lait/2022/NOUVELLE-PUBLICATION-La-consommation-de-produits-laitiers-en-2021> [Consulté le: 8 novembre 2022].

Frantzen, C.A. et al. 2017. Genomic Characterization of Dairy Associated Leuconostoc Species and Diversity of Leuconostocs in Undefined Mixed Mesophilic Starter Cultures. *Frontiers in Microbiology* 8. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00132> [Consulté le: 19 novembre 2022].

Frétin, M. et al. 2018. Bacterial community assembly from cow teat skin to ripened cheeses is influenced by grazing systems. *Scientific Reports* 8(1), p. 200. doi: 10.1038/s41598-017-18447-y.

Fröhlich-Wyder, M.-T., Arias-Roth, E. et Jakob, E. 2019. Cheese yeasts. *Yeast* 36(3), p. 129-141. doi: 10.1002/yea.3368.

Fröhlich-Wyder, M.-T., Bisig, W., Guggisberg, D., Jakob, E., Turgay, M. et Wechsler, D. 2017. Chapter 35 - Cheeses With Propionic Acid Fermentation. In: McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D., et Everett, D. W. éd. *Cheese (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press, p. 889-910. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124170124000351> [Consulté le: 6 septembre 2022].

Fujisawa, H. et Morita, M. 1997. Phage DNA packaging. *Genes to Cells* 2(9), p. 537-545. doi: 10.1046/j.1365-2443.1997.1450343.x.

Galaup, P. et al. 2015a. First isolation of *Brevibacterium* sp. pigments in the rind of an industrial red-smear-ripened soft cheese. *International Journal of Dairy Technology* 68(1), p. 144-147. doi: 10.1111/1471-0307.12211.

Galaup, P. et al. 2015b. First isolation of *Brevibacterium* sp. pigments in the rind of an industrial red-smear-ripened soft cheese. *International Journal of Dairy Technology* 68(1), p. 144-147. doi: 10.1111/1471-0307.12211.

Galaup, P., Flamin, C., Carlet, E. et Dufossé, L. 2005. HPLC analysis of the pigments produced by the microflora isolated from the 'Protected Designation of Origin' French red-smear soft cheeses Munster, Epoisses, Reblochon and Livarot. *Food Research International* 38(8), p. 855-860. doi: 10.1016/j.foodres.2005.01.011.

Gambino, M. et al. 2020. Phage S144, a New Polyvalent Phage Infecting *Salmonella* spp. and *Cronobacter sakazakii*. *International Journal of Molecular Sciences* 21(15), p. 5196. doi: 10.3390/ijms21155196.

García, P., Madera, C., Martínez, B. et Rodríguez, A. 2007. Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. *International Dairy Journal* 17(10), p. 1232-1239. doi: 10.1016/j.idairyj.2007.03.014.

- Garde, S., Arias, R., Gaya, P. et Nuñez, M. 2011. Occurrence of Clostridium spp. in ovine milk and Manchego cheese with late blowing defect: Identification and characterization of isolates. *International Dairy Journal* 21(4), p. 272-278. doi: 10.1016/j.idairyj.2010.11.003.
- Garneau, J.E. et Moineau, S. 2011. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microbial Cell Factories* 10(Suppl 1), p. S20. doi: 10.1186/1475-2859-10-S1-S20.
- Garnier, L. et al. 2017a. Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 241, p. 191-197. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026.
- Garnier, L., Valence, F. et Mounier, J. 2017b. Diversity and Control of Spoilage Fungi in Dairy Products: An Update. *Microorganisms* 5(3), p. 42. doi: 10.3390/microorganisms5030042.
- Gaucherel, C., Pommereau, F. et Hély, C. 2020. Understanding Ecosystem Complexity via Application of a Process-Based State Space rather than a Potential Surface. *Complexity* 2020, p. e7163920. doi: 10.1155/2020/7163920.
- Gaucheron, F., Le Graet, Y., Raulot, K. et Piot, M. 1997. Physicochemical characterization of iron-supplemented skim milk. *International Dairy Journal* 7(2), p. 141-148. doi: 10.1016/S0958-6946(96)00054-4.
- Gautier, M. et al. 1999. Bacteriophages of dairy propionibacteria. *Le Lait* 79(1), p. 93-104. doi: 10.1051/lait:199917.
- Gautier, M., Rouault, A., Lortal, S., Leloir, Y. et Patureau, D. 1992. Characterization of a phage infecting *Propionibacterium freudenreichii*. *Le Lait* 72(5), p. 431-435. doi: 10.1051/lait:1992531.
- Gautier, M., Rouault, A., Sommer, P. et Briandet, R. 1995a. Occurrence of *Propionibacterium freudenreichii* bacteriophages in swiss cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 61(7), p. 2572-2576. doi: 10.1128/aem.61.7.2572-2576.1995.
- Gautier, M., Rouault, A., Sommer, P., Briandet, R. et Cassin, D. 1995b. Bacteriophages infecting dairy propionibacteria. *Le Lait* 75(4_5), p. 427-434.
- Gavriš, E.Yu. et al. 2004. Three New Species of Brevibacteria, *Brevibacterium antiquum* sp. nov., *Brevibacterium aurantiacum* sp. nov., and *Brevibacterium permense* sp. nov. *Microbiology* 73(2), p. 176-183. doi: 10.1023/B:MICI.0000023986.52066.1e.
- Gillot, G. et al. 2017. Functional diversity within the *Penicillium roqueforti* species. *International Journal of Food Microbiology* 241, p. 141-150. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.001.
- Giuffrida, D. et al. 2016. Characterisation of the C50 carotenoids produced by strains of the cheese-ripening bacterium *Arthrobacter arilaitensis*. *International Dairy Journal* 55, p. 10-16. doi: 10.1016/j.idairyj.2015.11.005.

Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Mancini, L. et Fox, P.F. 2015. Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. *Trends in Food Science & Technology* 45(2), p. 167-178. doi: 10.1016/j.tifs.2015.07.016.

Goerges, S. et al. 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. *Applied and Environmental Microbiology* 74(7), p. 2210-2217. doi: 10.1128/AEM.01663-07.

Gross, M. 2018. On the origins of cheese. *Current Biology* 28(20), p. R1171-R1173. doi: 10.1016/j.cub.2018.10.008.

Groupe d'étude des marchés de restauration collective et de nutrition. 2009. LAITS ET PRODUITS LAITIERS. Disponible sur: https://www.economie.gouv.fr/files/directions_services/daj/marches_publics/oeap/gem/produits_laitiers/produits_laitiers.pdf.

Guenther, S. et Loessner, M.J. 2011. Bacteriophage biocontrol of *Listeria monocytogenes* on soft ripened white mold and red-smear cheeses. *Bacteriophage* 1(2), p. 94-100. doi: 10.4161/bact.1.2.15662.

Guglielmotti, D., Mercanti, D., Reinheimer, J. et Quiberoni, A.D.L. 2012. Review: Efficiency of Physical and Chemical Treatments on the Inactivation of Dairy Bacteriophages. *Frontiers in Microbiology* 2. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2011.00282> [Consulté le: 29 septembre 2022].

Guilloteau, P., Corring, T., Toullec, R. et Robelin, J. 1984. Enzyme potentialities of the abomasum and pancreas of the calf. I.--Effect of age in the preruminant. *Reproduction, Nutrition, Développement* 24(3), p. 315-325. doi: 10.1051/rnd:19840310.

Guinee, T.P. et Fox, P.F. 2017. Chapter 13 - Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. In: McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D., et Everett, D. W. éd. *Cheese (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press, p. 317-375. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124170124000132> [Consulté le: 6 octobre 2022].

Guo, J. et al. 2021. VirSorter2: a multi-classifier, expert-guided approach to detect diverse DNA and RNA viruses. *Microbiome* 9(1), p. 37. doi: 10.1186/s40168-020-00990-y.

Guzzon, R. et al. 2017. Exploring the microbiota of the red-brown defect in smear-ripened cheese by 454-pyrosequencing and its prevention using different cleaning systems. *Food Microbiology* 62, p. 160-168. doi: 10.1016/j.fm.2016.10.018.

Haaber, J., Penadés, J.R. et Ingmer, H. 2017. Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology* 25(11), p. 893-905. doi: 10.1016/j.tim.2017.05.011.

Hantsis-Zacharov, E. et Halpern, M. 2007. Culturable Psychrotrophic Bacterial Communities in Raw Milk and Their Proteolytic and Lipolytic Traits. *Applied and Environmental Microbiology* 73(22), p. 7162-7168. doi: 10.1128/AEM.00866-07.

Harrison, E. et Brockhurst, M.A. 2017. Ecological and Evolutionary Benefits of Temperate Phage: What Does or Doesn't Kill You Makes You Stronger. *BioEssays* 39(12), p. 1700112. doi: <https://doi.org/10.1002/bies.201700112>.

Hayes, S., Mahony, J., Nauta, A. et Van Sinderen, D. 2017. Metagenomic Approaches to Assess Bacteriophages in Various Environmental Niches. *Viruses* 9(6), p. 127. doi: 10.3390/v9060127.

Heck, J.M.L., van Valenberg, H.J.F., Dijkstra, J. et van Hooijdonk, A.C.M. 2009. Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. *Journal of Dairy Science* 92(10), p. 4745-4755. doi: 10.3168/jds.2009-2146.

Hickey, C.D., Fallico, V., Wilkinson, M.G. et Sheehan, J.J. 2018. Redefining the effect of salt on thermophilic starter cell viability, culturability and metabolic activity in cheese. *Food Microbiology* 69, p. 219-231. doi: 10.1016/j.fm.2017.08.015.

Hickey, M. 2017. Chapter 30 - Legislation in Relation to Cheese. In: McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D., et Everett, D. W. éd. *Cheese (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press, p. 757-778. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124170124000302> [Consulté le: 20 octobre 2022].

Hinrichs, J. 2001. Incorporation of whey proteins in cheese. *International Dairy Journal* 11(4), p. 495-503. doi: 10.1016/S0958-6946(01)00071-1.

Holzappel, W.H. et Wood, B.J.B. 2014. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. John Wiley & Sons.

Holzmann, H. et al. 2009. Tick-borne Encephalitis from Eating Goat Cheese in a Mountain Region of Austria. *Emerging Infectious Diseases* 15(10), p. 1671-1673. doi: 10.3201/eid1510.090743.

Honish, L. et al. 2005. An Outbreak of E. coli O157:H7 Hemorrhagic Colitis Associated with Unpasteurized Gouda Cheese. *Canadian Journal of Public Health* 96(3), p. 182-184. doi: 10.1007/BF03403686.

Hoyles, L., McCartney, A.L., Neve, H., Gibson, G.R., Sanderson, J.D., Heller, K.J. et van Sinderen, D. 2014. Characterization of virus-like particles associated with the human faecal and caecal microbiota. *Research in Microbiology* 165(10), p. 803-812. doi: 10.1016/j.resmic.2014.10.006.

Hsu, B.B. et al. 2019. Dynamic Modulation of the Gut Microbiota and Metabolome by Bacteriophages in a Mouse Model. *Cell Host & Microbe* 25(6), p. 803-814.e5. doi: 10.1016/j.chom.2019.05.001.

Hu, B., Margolin, W., Molineux, I.J. et Liu, J. 2015. Structural remodeling of bacteriophage T4 and host membranes during infection initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(35), p. E4919-E4928. doi: 10.1073/pnas.1501064112.

Hyman, P. et Abedon, S.T. 2010. Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance. In: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, p. 217-248. Disponible sur:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065216410700071> [Consulté le: 21 septembre 2022].

ICTV. 2022. Current ICTV Taxonomy Release | ICTV. Disponible sur: <https://ictv.global/taxonomy>.

INAO. 2009. Cahier des charges de l'AOP Langres. Disponible sur: <https://www.inao.gouv.fr/produit/4202>.

INAO. 2010. Cahier des charges de l'AOP Epoisses. Disponible sur: <https://www.inao.gouv.fr/produit/7071>.

INAO. 2013. *Cahier des charges Camembert de Normandie*. Disponible sur: <https://www.inao.gouv.fr/produit/4204> [Consulté le: 12 août 2022].

INAO. 2014a. Cahier des charges de l'AOP Livarot. Disponible sur: <https://www.inao.gouv.fr/produit/4593>.

INAO. 2014b. *Cahier des charges Valençay*. Disponible sur: <https://www.inao.gouv.fr/produit/13170> [Consulté le: 12 août 2022].

INAO. 2015a. Cahier des charges de l'AOP Maroilles. Disponible sur: <https://www.inao.gouv.fr/produit/13200>.

INAO. 2015b. Cahier des charges de l'AOP Pont-l'Evêque. Disponible sur: <https://www.inao.gouv.fr/eng/produit/13477>.

INAO. 2017. Cahier des charges de l'AOP Munster. Disponible sur: <https://www.inao.gouv.fr/produit/3283>.

INAO. 2020a. Appellation d'origine protégée/contrôlée (AOP/AOC). Disponible sur: <https://www.inao.gouv.fr/Les-signes-officiels-de-la-qualite-et-de-l-origine-SIQA/Appellation-d-origine-protgee-controlee-AOP-AOC>.

INAO. 2020b. Indication géographique protégée (IGP). Disponible sur: <https://www.inao.gouv.fr/Les-signes-officiels-de-la-qualite-et-de-l-origine-SIQA/Indication-geographique-protgee>.

INAO. 2020c. Label Rouge. Disponible sur: <https://www.inao.gouv.fr/Les-signes-officiels-de-la-qualite-et-de-l-origine-SIQA/Label-Rouge>.

INAO. 2020d. Spécialité traditionnelle garantie (STG). Disponible sur: <https://www.inao.gouv.fr/Les-signes-officiels-de-la-qualite-et-de-l-origine-SIQA/Specialite-traditionnelle-garantie-STG>.

INAO. 2022. Agriculture biologique. Disponible sur: <https://www.inao.gouv.fr/Les-signes-officiels-de-la-qualite-et-de-l-origine-SIQA/Agriculture-biologique>.

Irlinger, F. et al. 2012. Ecological and aromatic impact of two Gram-negative bacteria (*Psychrobacter celer* and *Hafnia alvei*) inoculated as part of the whole microbial community of

an experimental smear soft cheese. *International Journal of Food Microbiology* 153(3), p. 332-338. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.022.

Irlinger, F., Helinck, S. et Jany, J.L. 2017. Chapter 11 - Secondary and Adjunct Cultures. In: McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D., et Everett, D. W. éd. *Cheese (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press, p. 273-300. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124170124000119> [Consulté le: 6 avril 2022].

Irlinger, F., Layec, S., Hélinck, S. et Dugat-Bony, E. 2015a. Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS microbiology letters* 362(2), p. 1-11. doi: 10.1093/femsle/fnu015.

Irlinger, F., Layec, S., Hélinck, S. et Dugat-Bony, E. 2015b. Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS Microbiology Letters* 362(2), p. 1-11. doi: 10.1093/femsle/fnu015.

Irlinger, F. et Monnet, C. 2021. Temporal differences in microbial composition of Époisses cheese rinds during ripening and storage. *Journal of Dairy Science*. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030221004987> [Consulté le: 8 avril 2021].

Irlinger, F. et Mounier, J. 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology* 20(2), p. 142-148. doi: 10.1016/j.copbio.2009.02.016.

Ishikawa, M., Kodama, K., Yasuda, H., Okamoto-Kainuma, A., Koizumi, K. et Yamasato, K. 2007. Presence of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria in various cheeses. *Letters in Applied Microbiology* 44(3), p. 308-313. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02073.x.

Jaros, D. et Rohm, H. 2017. Chapter 3 - Rennets: Applied Aspects. In: McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D., et Everett, D. W. éd. *Cheese (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press, p. 53-67. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012417012400003X> [Consulté le: 3 novembre 2022].

Jenkins, T.C. et McGuire, M.A. 2006. Major Advances in Nutrition: Impact on Milk Composition. *Journal of Dairy Science* 89(4), p. 1302-1310. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72198-1.

Jenssen, H. et Hancock, R.E.W. 2009. Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie* 91(1), p. 19-29. doi: 10.1016/j.biochi.2008.05.015.

Jöudu, I., Henno, M., Kaart, T., Püssa, T. et Kärt, O. 2008. The effect of milk protein contents on the rennet coagulation properties of milk from individual dairy cows. *International Dairy Journal* 18(9), p. 964-967. doi: 10.1016/j.idairyj.2008.02.002.

Juillard, V., Foucaud, C., Desmazeaud, M. et Richard, J. 1996. Utilisation des sources d'azote du lait par *Lactococcus lactis*. *Le Lait* 76(1-2), p. 13-24. doi: 10.1051/lait:19961-22.

- Julien, M.-C., Dion, P., Lafrenière, C., Antoun, H. et Drouin, P. 2008. Sources of clostridia in raw milk on farms. *Applied and Environmental Microbiology* 74(20), p. 6348-6357. doi: 10.1128/AEM.00913-08.
- Kagkli, D.M., Vancanneyt, M., Hill, C., Vandamme, P. et Cogan, T.M. 2007. Enterococcus and Lactobacillus contamination of raw milk in a farm dairy environment. *International Journal of Food Microbiology* 114(2), p. 243-251. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.016.
- Kastman, E.K., Kamelamela, N., Norville, J.W., Cosetta, C.M., Dutton, R.J. et Wolfe, B.E. 2016. Biotic Interactions Shape the Ecological Distributions of *Staphylococcus* Species. *mBio* 7(5). Disponible sur: <http://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.01157-16> [Consulté le: 31 mai 2019].
- Kieft, K., Adams, A., Salamzade, R., Kalan, L. et Anantharaman, K. 2021. vRhyme enables binning of viral genomes from metagenomes. p. 2021.12.16.473018. Disponible sur: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.12.16.473018v1> [Consulté le: 9 décembre 2022].
- Kieft, K. et Anantharaman, K. 2022. Virus genomics: what is being overlooked? *Current Opinion in Virology* 53, p. 101200. doi: 10.1016/j.coviro.2022.101200.
- Kieft, K., Zhou, Z. et Anantharaman, K. 2020. VIBRANT: automated recovery, annotation and curation of microbial viruses, and evaluation of viral community function from genomic sequences. *Microbiome* 8(1), p. 90. doi: 10.1186/s40168-020-00867-0.
- Kiki, M.J. 2016. A new medium for the isolation and enrichment of halophilic actinobacteria. p. 7. doi: 10.7537/marslsj13011610.
- Kim, M.-S., Park, E.-J., Roh, S.W. et Bae, J.-W. 2011. Diversity and abundance of single-stranded DNA viruses in human feces. *Applied and Environmental Microbiology* 77(22), p. 8062-8070. doi: 10.1128/AEM.06331-11.
- Kintz, E., Davies, M.R., Hammarlöf, D.L., Canals, R., Hinton, J.C.D. et van der Woude, M.W. 2015. A BTP1 prophage gene present in invasive non-typhoidal Salmonella determines composition and length of the O-antigen of the lipopolysaccharide. *Molecular Microbiology* 96(2), p. 263-275. doi: 10.1111/mmi.12933.
- Kleppen, H.P., Bang, T., Nes, I.F. et Holo, H. 2011. Bacteriophages in milk fermentations: Diversity fluctuations of normal and failed fermentations. *International Dairy Journal* 21(9), p. 592-600. doi: 10.1016/j.idairyj.2011.02.010.
- Kleppen, H.P., Nes, I.F. et Holo, H. 2012. Characterization of a Leuconostoc Bacteriophage Infecting Flavor Producers of Cheese Starter Cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 78(18), p. 6769-6772. doi: 10.1128/AEM.00562-12.
- Klijn, N., Nieuwenhof, F.F., Hoolwerf, J.D., van der Waals, C.B. et Weerkamp, A.H. 1995. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 61(8), p. 2919-2924. doi: 10.1128/aem.61.8.2919-2924.1995.

- Koch, A.L. 1960. Encounter efficiency of coliphage-bacterium interaction. *Biochimica et Biophysica Acta* 39(2), p. 311-318. doi: 10.1016/0006-3002(60)90168-2.
- Konopka, A. 2009. What is microbial community ecology? *The ISME Journal* 3(11), p. 1223-1230. doi: 10.1038/ismej.2009.88.
- Kothe, C.I., Bolotin, A., Kraïem, B.-F., Dridi, B. et Renault, P. 2021. Unraveling the world of halophilic and halotolerant bacteria in cheese by combining cultural, genomic and metagenomic approaches. *International Journal of Food Microbiology* 358, p. 109312. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109312.
- Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P. et Drosinos, E.H. 2010. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control* 21(6), p. 805-815. doi: 10.1016/j.foodcont.2009.11.015.
- Krishnamurthy, S.R., Janowski, A.B., Zhao, G., Barouch, D. et Wang, D. 2016. Hyperexpansion of RNA Bacteriophage Diversity. *PLOS Biology* 14(3), p. e1002409. doi: 10.1371/journal.pbio.1002409.
- Kropinski, A.M., Mazzocco, A., Waddell, T.E., Lingohr, E. et Johnson, R.P. 2009. Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. In: Clokie, M. R. J. et Kropinski, A. M. éd. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*. Methods in Molecular Biology™. Totowa, NJ: Humana Press, p. 69-76. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_7 [Consulté le: 23 septembre 2022].
- Kuchtík, J., Šustová, K., Urban, T. et Zapletal, D. 2008. Effect of the stage of lactation on milk composition, its properties and the quality. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/228737539_Effect_of_the_stage_of_lactation_on_milk_composition_its_properties_and_the_quality_of_rennet_curdling_in_East_Friesian_ewes.
- Kuipers, J. et Giepmans, B.N.G. 2020. Neodymium as an alternative contrast for uranium in electron microscopy. *Histochemistry and Cell Biology* 153(4), p. 271-277. doi: 10.1007/s00418-020-01846-0.
- L. Kelly, A., Huppertz, T. et J. Sheehan, J. 2008. Pre-treatment of cheese milk: principles and developments. *Dairy Science & Technology* 88(4-5), p. 549-572.
- Ladero, V. et al. 2016. Q69 (an E. faecalis-Infecting Bacteriophage) As a Biocontrol Agent for Reducing Tyramine in Dairy Products. *Frontiers in Microbiology* 7, p. 445. doi: 10.3389/fmicb.2016.00445.
- Landaud, S., Helinck, S. et Bonnarme, P. 2008. Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77(6), p. 1191-1205. doi: 10.1007/s00253-007-1288-y.
- Larpin-Laborde, S. et al. 2011. Surface microbial consortia from Livarot, a French smear-ripened cheese. *Canadian Journal of Microbiology* 57(8), p. 651-660. doi: 10.1139/w11-050.

Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D. et Labrie, S. 2012. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Science & Technology* 92(5), p. 455-468. doi: 10.1007/s13594-011-0051-4.

Le, S. et al. 2013. Mapping the Tail Fiber as the Receptor Binding Protein Responsible for Differential Host Specificity of Pseudomonas aeruginosa Bacteriophages PaP1 and JG004. *PLOS ONE* 8(7), p. e68562. doi: 10.1371/journal.pone.0068562.

Leclercq-Perlat, M.-N., Buono, F., Lambert, D., Latrille, E., Spinnler, H.-E. et Corrieu, G. 2004. Controlled production of Camembert-type cheeses. Part I: Microbiological and physicochemical evolutions. *Journal of Dairy Research* 71(3), p. 346-354. doi: 10.1017/s0022029904000196.

Lee, K.L., Hubbard, L.C., Hern, S., Yildiz, I., Gratzl, M. et Steinmetz, N.F. 2013. Shape matters: the diffusion rates of TMV rods and CPMV icosahedrons in a spheroid model of extracellular matrix are distinct. *Biomaterials Science* 1(6), p. 581-588. doi: 10.1039/C3BM00191A.

Légifrance. 2015. Décret n°2007-628 du 27 avril 2007 relatif aux fromages et spécialités fromagères. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/LEGITEXT000006056036/>.

Lemieux, L. et Simard, R. 1991. Bitter flavour in dairy products. 1. A review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture. p. 38.

Lessard, M.-H., Bélanger, G., St-Gelais, D. et Labrie, S. 2012. The Composition of Camembert Cheese-Ripening Cultures Modulates both Mycelial Growth and Appearance. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(6), p. 1813-1819. doi: 10.1128/AEM.06645-11.

Lessard, M.-H., Viel, C., Boyle, B., St-Gelais, D. et 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(1), p. 235. doi: 10.1186/1471-2164-15-235.

Leyva Salas, M., Mounier, J., Maillard, M.-B., Valence, F., Coton, E. et Thierry, A. 2019. Identification and quantification of natural compounds produced by antifungal bioprotective cultures in dairy products. *Food Chemistry* 301, p. 125260. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125260.

Li, N., Wang, Y., You, C., Ren, J., Chen, W., Zheng, H. et Liu, Z. 2018. Variation in Raw Milk Microbiota Throughout 12 Months and the Impact of Weather Conditions. *Scientific Reports* 8(1), p. 2371. doi: 10.1038/s41598-018-20862-8.

LibreTexts. 2020. *The Effects of pH and Temperature on Microbial Growth*. Disponible sur: [https://bio.libretexts.org/Courses/Manchester_Community_College_\(MCC\)/Remix_of_Openstax%3AMicrobiology_by_Parker_Schneegurt_et_al/08%3A_Microbial_Growth/8.03%3A_The_Effects_of_pH_on_Microbial_Growth](https://bio.libretexts.org/Courses/Manchester_Community_College_(MCC)/Remix_of_Openstax%3AMicrobiology_by_Parker_Schneegurt_et_al/08%3A_Microbial_Growth/8.03%3A_The_Effects_of_pH_on_Microbial_Growth) [Consulté le: 17 novembre 2022].

Linares, D.M., Martín, M., Ladero, V., Alvarez, M.A. et Fernández, M. 2011. Biogenic Amines in Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51(7), p. 691-703. doi: 10.1080/10408398.2011.582813.

Loizzo, M.R., Menichini, F., Picci, N., Puoci, F., Spizzirri, U.G. et Restuccia, D. 2013. Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese. *Trends in Food Science & Technology* 30(1), p. 38-55. doi: 10.1016/j.tifs.2012.11.005.

Lortal, S. et Chapot-Chartier, M.-P. 2005. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal* 15(6), p. 857-871. doi: 10.1016/j.idairyj.2004.08.024.

Łoś, M. et Węgrzyn, G. 2012. Chapter 9 - Pseudolysogeny. In: Łobocka, M. et Szybalski, W. T. éd. *Advances in Virus Research*. Bacteriophages, Part A. Academic Press, p. 339-349. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123946218000194> [Consulté le: 13 septembre 2022].

Lu, M.-J. et Henning, U. 1994. Superinfection exclusion by T-even-type coliphages. *Trends in Microbiology* 2(4), p. 137-139. doi: 10.1016/0966-842X(94)90601-7.

Lucey, J.A. 2017. Chapter 7 - Formation, Structural Properties, and Rheology of Acid-Coagulated Milk Gels. In: McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D., et Everett, D. W. éd. *Cheese (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press, p. 179-197. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124170124000077> [Consulté le: 8 novembre 2022].

Ly-Chatain, M.H., Durand, L., Rigobello, V., Vera, A. et Demarigny, Y. 2011. Direct Quantitative Detection and Identification of Lactococcal Bacteriophages from Milk and Whey by Real-Time PCR: Application for the Detection of Lactococcal Bacteriophages in Goat's Raw Milk Whey in France. *International Journal of Microbiology* 2011, p. e594369. doi: 10.1155/2011/594369.

Macori, G. et Cotter, P.D. 2018. Novel insights into the microbiology of fermented dairy foods. *Current Opinion in Biotechnology* 49, p. 172-178. doi: 10.1016/j.copbio.2017.09.002.

Mahony, J., Murphy, J. et van Sinderen, D. 2012. Lactococcal 936-type phages and dairy fermentation problems: from detection to evolution and prevention. *Frontiers in Microbiology* 3, p. 335. doi: 10.3389/fmicb.2012.00335.

Maijala, R.L., Eerola, S.H., Aho, M.A. et Hirn, J.A. 1993. The Effect of GDL-induced pH Decrease on the Formation of Biogenic Amines in Meat. *Journal of Food Protection* 56(2), p. 125-129. doi: 10.4315/0362-028X-56.2.125.

Mallet, A., Guéguen, M., Kauffmann, F., Chesneau, C., Sesboué, A. et Desmasures, N. 2012. Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. *International Dairy Journal* 27(1), p. 13-21. doi: 10.1016/j.idairyj.2012.07.009.

Maranger, R. et Bird, D. 1995. Viral abundance in aquatic systems: a comparison between marine and fresh waters. *Marine Ecology Progress Series* 121, p. 217-226. doi: 10.3354/meps121217.

Marcellino, N. et Benson, D.R. 2014. The Good, The Bad, and the Ugly: Tales of Mold-Ripened Cheese. In: *Cheese and Microbes*. John Wiley & Sons, Ltd, p. 95-131. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555818593.ch5> [Consulté le: 6 septembre 2022].

- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M. et Herman, L. 2012. Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11(2), p. 133-147. doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00183.x.
- Marcó, M.B., Moineau, S. et Quiberoni, A. 2012. Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage* 2(3), p. 149-158. doi: 10.4161/bact.21868.
- Marco, M.L. et al. 2021. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 18(3), p. 196-208. doi: 10.1038/s41575-020-00390-5.
- Marinier, E., Brown, D.G. et McConkey, B.J. 2015. Pollux: platform independent error correction of single and mixed genomes. *BMC Bioinformatics* 16(1), p. 10. doi: 10.1186/s12859-014-0435-6.
- Marino, M., Maifreni, M., Moret, S. et Rondinini, G. 2000. The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. *Letters in Applied Microbiology* 31(2), p. 169-173. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00783.x.
- Markovinović, L. et al. 2016. An outbreak of tick-borne encephalitis associated with raw goat milk and cheese consumption, Croatia, 2015. *Infection* 44(5), p. 661-665. doi: 10.1007/s15010-016-0917-8.
- Martí De Olives, A., Díaz, J.R., Molina, M.P. et Peris, C. 2013. Quantification of milk yield and composition changes as affected by subclinical mastitis during the current lactation in sheep. *Journal of Dairy Science* 96(12), p. 7698-7708. doi: 10.3168/jds.2013-6998.
- Martin, N.H., Murphy, S.C., Ralyea, R.D., Wiedmann, M. et Boor, K.J. 2011. When cheese gets the blues: *Pseudomonas fluorescens* as the causative agent of cheese spoilage. *Journal of Dairy Science* 94(6), p. 3176-3183. doi: 10.3168/jds.2011-4312.
- Martínez, J.M., Swan, B.K. et Wilson, W.H. 2014. Marine viruses, a genetic reservoir revealed by targeted viromics. *The ISME Journal* 8(5), p. 1079-1088. doi: 10.1038/ismej.2013.214.
- Masotti, F., Cattaneo, S., Stuknytė, M. et De Noni, I. 2017. Technological tools to include whey proteins in cheese: Current status and perspectives. *Trends in Food Science & Technology* 64, p. 102-114. doi: 10.1016/j.tifs.2017.04.007.
- Mateo, M.J., Everard, C.D., Fagan, C.C., O'Donnell, C.P., Castillo, M., Payne, F.A. et O'Callaghan, D.J. 2009. Effect of milk fat concentration and gel firmness on syneresis during curd stirring in cheese-making. *International Dairy Journal* 19(4), p. 264-268. doi: 10.1016/j.idairyj.2008.10.014.
- Mayo, B., Rodríguez, J., Vázquez, L. et Flórez, A.B. 2021. Microbial Interactions within the Cheese Ecosystem and Their Application to Improve Quality and Safety. *Foods* 10(3), p. 602. doi: 10.3390/foods10030602.
- McSweeney, P.L.H. 2007. *Cheese problems solved*. p. 402.

McSweeney, P.L.H. 2017. Chapter 14 - Biochemistry of Cheese Ripening: Introduction and Overview. In: McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D., et Everett, D. W. éd. *Cheese (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press, p. 379-387. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124170124000144> [Consulté le: 9 novembre 2022].

McSweeney, P.L.H., Fox, P.F. et Ciocia, F. 2017. Chapter 16 - Metabolism of Residual Lactose and of Lactate and Citrate. In: McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D., et Everett, D. W. éd. *Cheese (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press, p. 411-421. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124170124000168> [Consulté le: 21 novembre 2022].

McSweeney, P.L.H. et Sousa, M.J. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait* 80(3), p. 293-324. doi: 10.1051/lait:2000127.

de Melo, A.G., Levesque, S. et Moineau, S. 2018. Phages as friends and enemies in food processing. *Current Opinion in Biotechnology* 49, p. 185-190. doi: 10.1016/j.copbio.2017.09.004.

de Melo, A.G., Rousseau, G.M., Tremblay, D.M., Labrie, S.J. et Moineau, S. 2020. DNA tandem repeats contribute to the genetic diversity of *Brevibacterium aurantiacum* phages. *Environmental Microbiology* 22(8), p. 3413-3428. doi: 10.1111/1462-2920.15113.

Merchán, A.V., Ruiz-Moyano, S., Hernández, M.V., Martín, A., Lorenzo, M.J. et Benito, M.J. 2022. Characterization of autochthonal *Hafnia* spp. strains isolated from Spanish soft raw ewe's milk PDO cheeses to be used as adjunct culture. *International Journal of Food Microbiology* 373, p. 109703. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109703.

Metin, B. 2018. *Filamentous Fungi in Cheese Production*. Disponible sur: <https://www.igi-global.com/chapter/filamentous-fungi-in-cheese-production/www.igi-global.com/chapter/filamentous-fungi-in-cheese-production/202812> [Consulté le: 6 septembre 2022].

Microbiology Notes. 2022. Bacterial Growth and Different Environmental Factors Affect Bacterial Growth. Disponible sur: https://microbiologynote.com/bacterial-growth-and-different-environmental-factors-affect-bacterial-growth/#Effect_of_Temperature_on_Bacterial_Growth.

Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire. 2019. *Le bien-être et la protection des vaches laitières*. Disponible sur: <https://agriculture.gouv.fr/le-bien-etre-et-la-protection-des-vaches-laitieres> [Consulté le: 20 octobre 2022].

Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire. 2020. *La Spécialité traditionnelle garantie Berthoud, fleuron de la gastronomie savoyarde*. Disponible sur: <https://agriculture.gouv.fr/la-specialite-traditionnelle-garantie-berthoud-fleuron-de-la-gastronomie-savoyarde> [Consulté le: 18 août 2022].

- Modi, R., Hirvi, Y., Hill, A. et Griffiths, M.W. 2001. Effect of phage on survival of Salmonella enteritidis during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *Journal of Food Protection* 64(7), p. 927-933. doi: 10.4315/0362-028x-64.7.927.
- Monnet, C. et al. 2010. The *Arthrobacter arilaitensis* Re117 Genome Sequence Reveals Its Genetic Adaptation to the Surface of Cheese. *PLOS ONE* 5(11), p. e15489. doi: 10.1371/journal.pone.0015489.
- Monnet, C., Back, A. et Irlinger, F. 2012. Growth of Aerobic Ripening Bacteria at the Cheese Surface Is Limited by the Availability of Iron. *Applied and Environmental Microbiology* 78(9), p. 3185-3192. doi: 10.1128/AEM.00085-12.
- Monnet, C., Landaud, S., Bonnarme, P. et Swennen, D. 2015. Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. *FEMS microbiology letters* 362(1), p. 1-9. doi: 10.1093/femsle/fnu025.
- Montel, M.-C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N. et Berthier, F. 2014a. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology* 177, p. 136-154. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019.
- Montel, M.-C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N. et Berthier, F. 2014b. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology* 177, p. 136-154. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019.
- Morin-Sardin, S., Rigalma, K., Coroller, L., Jany, J.-L. et Coton, E. 2016. Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. *Food Microbiology* 56, p. 69-79. doi: 10.1016/j.fm.2015.11.019.
- Moroni, O., Jean, J., Autret, J. et Fliss, I. 2002. Inactivation of lactococcal bacteriophages in liquid media using dynamic high pressure. *International Dairy Journal* 12(11), p. 907-913. doi: 10.1016/S0958-6946(02)00118-8.
- Mounier, J. et al. 2005. Surface Microflora of Four Smear-Ripened Cheeses. *Applied and Environmental Microbiology* 71(11), p. 6489-6500. doi: 10.1128/AEM.71.11.6489-6500.2005.
- Mounier, J. et al. 2006. Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology* 101(3), p. 668-681. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02922.x.
- Mounier, J., Coton, M., Irlinger, F., Landaud, S. et Bonnarme, P. 2017. Chapter 38 - Smear-Ripened Cheeses. In: McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D., et Everett, D. W. éd. *Cheese (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press, p. 955-996. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124170124000387> [Consulté le: 3 décembre 2019].
- Mounier, J., Monnet, C., Jacques, N., Antoinette, A. et Irlinger, F. 2009. Assessment of the microbial diversity at the surface of Livarot cheese using culture-dependent and independent

approaches. *International Journal of Food Microbiology* 133(1), p. 31-37. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.020.

Mounier, J., Rea, M.C., O'Connor, P.M., Fitzgerald, G.F. et Cogan, T.M. 2007. Growth Characteristics of *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, and *Staphylococcus* spp. Isolated from Surface-Ripened Cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 73(23), p. 7732-7739. doi: 10.1128/AEM.01260-07.

Mousseau, T.A. et Roff, D.A. 1987. Natural selection and the heritability of fitness components. *Heredity* 59(2), p. 181-197. doi: 10.1038/hdy.1987.113.

Moyer, C.L., Eric Collins, R. et Morita, R.Y. 2017. Psychrophiles and Psychrotrophs. In: *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier, p. B9780128096338022000. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128096338022822> [Consulté le: 21 novembre 2022].

Mueller-Merbach, M., Peter, K., Weidendorfer, K. et Hinrichs, J. 2007. Diffusion of bacteriophages in an agar gel and in a fermented milk matrix. *Milchwissenschaft* 62, p. 24-27.

Muhammed, M.K., Krych, L., Nielsen, D.S. et Vogensen, F.K. 2017. A high-throughput qPCR system for simultaneous quantitative detection of dairy *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc* bacteriophages. *PLOS ONE* 12(3), p. e0174223. doi: 10.1371/journal.pone.0174223.

Müller-Merbach, M., Rauscher, T. et Hinrichs, J. 2005. Inactivation of bacteriophages by thermal and high-pressure treatment. *International Dairy Journal* 15(6), p. 777-784. doi: 10.1016/j.idairyj.2004.08.019.

Nakakoshi, M., Nishioka, H. et Katayama, E. 2011. New versatile staining reagents for biological transmission electron microscopy that substitute for uranyl acetate. *Journal of Electron Microscopy* 60(6), p. 401-407. doi: 10.1093/jmicro/df084.

Nobrega, F.L. et al. 2018. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature Reviews Microbiology* 16(12), p. 760-773. doi: 10.1038/s41579-018-0070-8.

Noordman, W.H., Reissbrodt, R., Bongers, R.S., Rademaker, J.L.W., Bockelmann, W. et Smit, G. 2006. Growth stimulation of *Brevibacterium* sp. by siderophores. *Journal of Applied Microbiology* 101(3), p. 637-646. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02928.x.

Nutrition, C. for F.S. and A. 2022. Food Safety and Raw Milk. *FDA*. Disponible sur: <https://www.fda.gov/food/buy-store-serve-safe-food/food-safety-and-raw-milk> [Consulté le: 20 octobre 2022].

Okaiyeto, K., Nwodo, U.U., Mabinya, L.V. et Okoh, A.I. 2013. Characterization of a Biofloculant Produced by a Consortium of *Halomonas* sp. Okoh and *Micrococcus* sp. Leo. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10(10), p. 5097-5110. doi: 10.3390/ijerph10105097.

Oliver, S.P., Boor, K.J., Murphy, S.C. et Murinda, S.E. 2009. *Food Safety Hazards Associated with Consumption of Raw Milk*. Disponible sur: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2009.0302> [Consulté le: 17 août 2022].

del Olmo, A., Calzada, J. et Nuñez, M. 2018. The blue discoloration of fresh cheeses: A worldwide defect associated to specific contamination by *Pseudomonas fluorescens*. *Food Control* 86, p. 359-366. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.12.001.

Ortmann, A.C. et Suttle, C.A. 2009. Determination of Virus Abundance by Epifluorescence Microscopy. In: Clokie, M. R. J. et Kropinski, A. M. éd. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*. Methods in Molecular Biology™. Totowa, NJ: Humana Press, p. 87-95. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_10 [Consulté le: 28 septembre 2022].

O'Sullivan, L., Bolton, D., McAuliffe, O. et Coffey, A. 2019. Bacteriophages in Food Applications: From Foe to Friend. *Annual Review of Food Science and Technology* 10(1), p. 151-172. doi: 10.1146/annurev-food-032818-121747.

O'Sullivan, L., Bolton, D., McAuliffe, O. et Coffey, A. 2020. The use of bacteriophages to control and detect pathogens in the dairy industry. *International Journal of Dairy Technology* 73(1), p. 1-11. doi: 10.1111/1471-0307.12641.

Pangallo, D., Šaková, N., Koreňová, J., Puškárová, A., Kraková, L., Valík, L. et Kuchta, T. 2014. Microbial diversity and dynamics during the production of May bryndza cheese. *International Journal of Food Microbiology* 170, p. 38-43. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.015.

Panthi, R.R., Jordan, K.N., Kelly, A.L. et Sheehan, J.J. (Diarmuid). 2017. Chapter 2 - Selection and Treatment of Milk for Cheesemaking. In: McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D., et Everett, D. W. éd. *Cheese (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press, p. 23-50. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124170124000028> [Consulté le: 16 mars 2022].

Parente, E., Cogan, T.M. et Powell, I.B. 2017. Chapter 8 - Starter Cultures: General Aspects. In: McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D., et Everett, D. W. éd. *Cheese (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press, p. 201-226. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124170124000089> [Consulté le: 16 mars 2022].

Parlement européen et conseil de l'Union Européenne. 2004. RÈGLEMENT (CE) No 853/2004.

Pazzola, M., Stocco, G., Dettori, M.L., Bittante, G. et Vacca, G.M. 2019. Effect of goat milk composition on cheesemaking traits and daily cheese production. *Journal of Dairy Science* 102(5), p. 3947-3955. doi: 10.3168/jds.2018-15397.

Pham, N.-P., Landaud, S., Lieben, P., Bonnarme, P. et Monnet, C. 2019. Transcription Profiling Reveals Cooperative Metabolic Interactions in a Microbial Cheese-Ripening Community Composed of *Debaryomyces hansenii*, *Brevibacterium aurantiacum*, and *Hafnia alvei*. *Frontiers in Microbiology* 10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01901> [Consulté le: 14 octobre 2022].

- Pońska, M. et Sokołowska, B. 2019. Bacteriophages—a new hope or a huge problem in the food industry. *AIMS Microbiology* 5(4), p. 324-346. doi: 10.3934/microbiol.2019.4.324.
- Pujato, S.A., Quiberoni, A. et Mercanti, D.J. 2019. Bacteriophages on dairy foods. *Journal of Applied Microbiology* 126(1), p. 14-30. doi: 10.1111/jam.14062.
- Purko, M., Nelson, W.O. et Wood, W.A. 1951. The Associative Action Between Certain Yeasts and Bacterium Linens. *Journal of Dairy Science* 34(7), p. 699-705. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(51)91768-7.
- Quail, M.A. et al. 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 13(1), p. 341. doi: 10.1186/1471-2164-13-341.
- Queiroz, L.L., Lacorte, G.A., Isidoro, W.R., Landgraf, M., de Melo Franco, B.D.G., Pinto, U.M. et Hoffmann, C. 2022. High Level of Interaction between Phages and Bacteria in an Artisanal Raw Milk Cheese Microbial Community. *mSystems* 0(0), p. e00564-22. doi: 10.1128/msystems.00564-22.
- Quigley, L. et al. 2016. Thermus and the Pink Discoloration Defect in Cheese. *mSystems* 1(3), p. e00023-16. doi: 10.1128/mSystems.00023-16.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. et Cotter, P.D. 2012. High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses. *Applied and Environmental Microbiology* 78(16), p. 5717-5723. doi: 10.1128/AEM.00918-12.
- Ravat, F., Jault, P. et Gabard, J. 2015. Bactériophages et phagothérapie: utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. *Annals of Burns and Fire Disasters* 28(1), p. 13-20.
- Raymond-Fleury, A. et al. 2022. Analysis of Microbiota Persistence in Quebec's Terroir Cheese Using a Metabarcoding Approach. *Microorganisms* 10(7), p. 1381. doi: 10.3390/microorganisms10071381.
- Rea, M.C. et al. 2007. Stability of the biodiversity of the surface consortia of Gubbeen, a red-smear cheese. *Journal of Dairy Science* 90(5), p. 2200-2210. doi: 10.3168/jds.2006-377.
- Réseau Bactériophage France. 2022. *Historique de l'étude des bactériophages*. Disponible sur: <https://site.phages.fr/decouvrir-historique/historique/> [Consulté le: 9 septembre 2022].
- Reyes, A., Wu, M., McNulty, N.P., Rohwer, F.L. et Gordon, J.I. 2013. Gnotobiotic mouse model of phage–bacterial host dynamics in the human gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(50), p. 20236-20241. doi: 10.1073/pnas.1319470110.
- del Rio, B., Binetti, A.G., Martín, M.C., Fernández, M., Magadán, A.H. et Alvarez, M.A. 2007. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiology* 24(1), p. 75-81. doi: 10.1016/j.fm.2006.03.001.

del Rio, B., Sánchez-Llana, E., Martínez, N., Fernández, M., Ladero, V. et Alvarez, M.A. 2021. Isolation and Characterization of Enterococcus faecalis-Infecting Bacteriophages From Different Cheese Types. *Frontiers in Microbiology* 11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.592172> [Consulté le: 7 mars 2022].

Rodriguez-R, L.M. et Konstantinidis, K.T. 2014. Estimating coverage in metagenomic data sets and why it matters. *The ISME Journal* 8(11), p. 2349-2351. doi: 10.1038/ismej.2014.76.

Romero, D.A., Magill, D., Millen, A., Horvath, P. et Fremaux, C. 2020. Dairy lactococcal and streptococcal phage-host interactions: an industrial perspective in an evolving phage landscape. *Fems Microbiology Reviews* 44(6), p. 909-932. doi: 10.1093/femsre/fuaa048.

Roose-Amsaleg, C., Fedala, Y., Vénien-Bryan, C., Garnier, J., Boccara, A.-C. et Boccara, M. 2017. Utilization of interferometric light microscopy for the rapid analysis of virus abundance in a river. *Research in Microbiology* 168(5), p. 413-418. doi: 10.1016/j.resmic.2017.02.004.

Rosario, K. et Breitbart, M. 2011. Exploring the viral world through metagenomics. *Current Opinion in Virology* 1(4), p. 289-297. doi: 10.1016/j.coviro.2011.06.004.

Rudolf, M. et Scherer, S. 2001. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *International Journal of Food Microbiology* 63(1), p. 91-98. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00413-X.

Sablé, S. et Cottenceau, G. 1999. Current Knowledge of Soft Cheeses Flavor and Related Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(12), p. 4825-4836. doi: 10.1021/jf990414f.

Sahiro, K., Kawato, Y., Koike, K., Sano, T., Nakai, T. et Sadakane, M. 2022. Preyssler-type phosphotungstate is a new family of negative-staining reagents for the TEM observation of viruses. *Scientific Reports* 12(1), p. 7554. doi: 10.1038/s41598-022-11405-3.

Salque, M., Bogucki, P.I., Pyzel, J., Sobkowiak-Tabaka, I., Grygiel, R., Szmyt, M. et Evershed, R.P. 2013. Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium BC in northern Europe. *Nature* 493(7433), p. 522-525. doi: 10.1038/nature11698.

Samson, J.E. et Moineau, S. 2010. Characterization of *Lactococcus lactis* Phage 949 and Comparison with Other Lactococcal Phages. *Applied and Environmental Microbiology* 76(20), p. 6843-6852. doi: 10.1128/AEM.00796-10.

Sanger, F. et al. 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature* 265(5596), p. 687-695. doi: 10.1038/265687a0.

Sanger, F., Coulson, A.R., Hong, G.F., Hill, D.F. et Petersen, G.B. 1982. Nucleotide sequence of bacteriophage λ DNA. *Journal of Molecular Biology* 162(4), p. 729-773. doi: 10.1016/0022-2836(82)90546-0.

Sausset, R. et al. 2022. Comparison of interferometric light microscopy with nanoparticle tracking analysis for the study of extracellular vesicles and bacteriophages. p. 2022.10.07.511248. Disponible sur:

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.10.07.511248v1> [Consulté le: 9 décembre 2022].

Sausset, R., Petit, M.A., Gaboriau-Routhiau, V. et De Paepe, M. 2020. New insights into intestinal phages. *Mucosal Immunology* 13(2), p. 205-215. doi: 10.1038/s41385-019-0250-5.

Schlesinger, M. 1932. Über die Bindung des Bakteriophagen an homologe Bakterien. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* 114(1), p. 149-160. doi: 10.1007/BF02176515.

Schwartz, M. 1976. The adsorption of coliphage lambda to its host: Effect of variations in the surface density of receptor and in phage-receptor affinity. *Journal of Molecular Biology* 103(3), p. 521-536. doi: 10.1016/0022-2836(76)90215-1.

Sciara, G. et al. 2010. Structure of lactococcal phage p2 baseplate and its mechanism of activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(15), p. 6852-6857. doi: 10.1073/pnas.1000232107.

Sedlar, K., Kupkova, K. et Provaznik, I. 2017. Bioinformatics strategies for taxonomy independent binning and visualization of sequences in shotgun metagenomics. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 15, p. 48-55. doi: 10.1016/j.csbj.2016.11.005.

Segata, N., Boernigen, D., Tickle, T.L., Morgan, X.C., Garrett, W.S. et Huttenhower, C. 2013. Computational meta'omics for microbial community studies. *Molecular Systems Biology* 9(1), p. 666. doi: 10.1038/msb.2013.22.

Seiler, H. et Busse, M. 1990. The yeasts of cheese brines. *International Journal of Food Microbiology* 11(3-4), p. 289-303. doi: 10.1016/0168-1605(90)90022-w.

Shalaby, A.R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* 29(7), p. 675-690. doi: 10.1016/S0963-9969(96)00066-X.

Shkoporov, A.N. et al. 2019. The Human Gut Virome Is Highly Diverse, Stable, and Individual Specific. *Cell Host & Microbe* 26(4), p. 527-541.e5. doi: 10.1016/j.chom.2019.09.009.

Sieuwerds, S., de Bok, F.A.M., Hugenholtz, J. et van Hylckama Vlieg, J.E.T. 2008. Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: from Classical to Genomics Approaches. *Applied and Environmental Microbiology* 74(16), p. 4997-5007. doi: 10.1128/AEM.00113-08.

Silva, C.C.G., Silva, S.P.M. et Ribeiro, S.C. 2018. Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. *Frontiers in Microbiology* 9, p. 594. doi: 10.3389/fmicb.2018.00594.

Simmonds, P. et al. 2017. Virus taxonomy in the age of metagenomics. *Nature Reviews Microbiology* 15(3), p. 161-168. doi: 10.1038/nrmicro.2016.177.

Skanata, A. et Kussell, E. 2021. Ecological memory preserves phage resistance mechanisms in bacteria. *Nature Communications* 12(1), p. 6817. doi: 10.1038/s41467-021-26609-w.

- Somers, E.B., Johnson, M.E. et Wong, A.C. 2001. Biofilm formation and contamination of cheese by nonstarter lactic acid bacteria in the dairy environment. *Journal of Dairy Science* 84(9), p. 1926-1936. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74634-6.
- Song, H.-S., Cannon, W.R., Beliaev, A.S. et Konopka, A. 2014. Mathematical Modeling of Microbial Community Dynamics: A Methodological Review. *Processes* 2(4), p. 711-752. doi: 10.3390/pr2040711.
- Steele, J., Broadbent, J. et Kok, J. 2013. Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. *Current Opinion in Biotechnology* 24(2), p. 135-141. doi: 10.1016/j.copbio.2012.12.001.
- Stent, G.S. 1963. Molecular biology of bacterial viruses. *Molecular biology of bacterial viruses*. Disponible sur: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19640101695> [Consulté le: 15 septembre 2022].
- Storms, Z.J. et Sauvageau, D. 2015. Modeling tailed bacteriophage adsorption: Insight into mechanisms. *Virology* 485, p. 355-362. doi: 10.1016/j.virol.2015.08.007.
- Suárez, B., Ferreirós, C.M. et Criado, M.T. 1992. Adherence of psychrotrophic bacteria to dairy equipment surfaces. *The Journal of Dairy Research* 59(3), p. 381-388. doi: 10.1017/s002202990003065x.
- Succurro, A., Moejes, F.W. et Ebenhöf, O. 2017. A Diverse Community To Study Communities: Integration of Experiments and Mathematical Models To Study Microbial Consortia. *Journal of Bacteriology* 199(15), p. e00865-16. doi: 10.1128/JB.00865-16.
- Sudun, Wulijidelligen, Arakawa, K., Miyamoto, M. et Miyamoto, T. 2013. Interaction between lactic acid bacteria and yeasts in airag, an alcoholic fermented milk. *Animal Science Journal* 84(1), p. 66-74. doi: 10.1111/j.1740-0929.2012.01035.x.
- Sullivan, M.B., Weitz, J.S. et Wilhelm, S. 2017. Viral ecology comes of age. *Environmental Microbiology Reports* 9(1), p. 33-35. doi: <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12504>.
- Sutthiwong, N., Sukdee, P., Lekhvat, S. et Dufossé, L. 2021. Identification of Red Pigments Produced by Cheese-Ripening Bacterial Strains of *Glutamicibacter arilaitensis* Using HPLC. *Dairy* 2(3), p. 396-409. doi: 10.3390/dairy2030031.
- Sutton, J.D. 1989. Altering Milk Composition by Feeding. *Journal of Dairy Science* 72(10), p. 2801-2814. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79426-1.
- Tamang, J.P. et Kailasapathy, K. 2010. *Fermented Foods and Beverages Of the World*. Disponible sur: <https://researchdirect.westernsydney.edu.au/islandora/object/uws%3A17790/> [Consulté le: 14 décembre 2022].
- Tansley, A.G. 1935. The Use and Abuse of Vegetational Concepts and Terms. *Ecology* 16(3), p. 284-307. doi: 10.2307/1930070.

- Thierry, A. et Maillard, M.-B. 2002. Production of cheese flavour compounds derived from amino acid catabolism by *Propionibacterium freudenreichii*. *Le Lait* 82(1), p. 17-32. doi: 10.1051/lait:2001002.
- Thomas, R., Berdjeb, L., Sime-Ngando, T. et Jacquet, S. 2011. Viral abundance, production, decay rates and life strategies (lysogeny versus lysis) in Lake Bourget (France). *Environmental Microbiology* 13(3), p. 616-630. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02364.x.
- Toit, M. du, Huch, M., Cho, G.-S. et Franz, C.M.A.P. 2014. The genus *Streptococcus*. In: *Lactic Acid Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, p. 457-505. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118655252.ch28> [Consulté le: 28 septembre 2022].
- Torkar, K.G. et Vengušt, A. 2008. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control* 19(6), p. 570-577. doi: 10.1016/j.foodcont.2007.06.008.
- Turkki, V., Alppila, E., Ylä-Herttua, S. et Lesch, H.P. 2021. Experimental Evaluation of an Interferometric Light Microscopy Particle Counter for Titering and Characterization of Virus Preparations. *Viruses* 13(5), p. 939. doi: 10.3390/v13050939.
- Turner, D., Kropinski, A.M. et Adriaenssens, E.M. 2021. A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses* 13(3), p. 506. doi: 10.3390/v13030506.
- Twort. 1915. *An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses* by Twort FW, L.R.C.P. Lond., M.R.C.S. (From the Laboratories of the Brown Institution, London). *Bacteriophage* 1(3), p. 127-129. doi: 10.4161/bact.1.3.16737.
- Varming, C., Andersen, L.T., Petersen, M.A. et Ardö, Y. 2013. Flavour compounds and sensory characteristics of cheese powders made from matured cheeses. *International Dairy Journal* 30(1), p. 19-28. doi: 10.1016/j.idairyj.2012.11.002.
- Vasu, K. et Nagaraja, V. 2013. Diverse Functions of Restriction-Modification Systems in Addition to Cellular Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77(1), p. 53-72. doi: 10.1128/MMBR.00044-12.
- Verdier-Metz, I., Gagne, G., Bornes, S., Monsallier, F., Veisseire, P., Delbès-Paus, C. et Montel, M.-C. 2012. Cow Teat Skin, a Potential Source of Diverse Microbial Populations for Cheese Production. *Applied and Environmental Microbiology* 78(2), p. 326-333. doi: 10.1128/AEM.06229-11.
- Verreault, D. et al. 2011. Detection of Airborne Lactococcal Bacteriophages in Cheese Manufacturing Plants. *Applied and Environmental Microbiology* 77(2), p. 491-497. doi: 10.1128/AEM.01391-10.
- Vincent, A.T., Derome, N., Boyle, B., Culley, A.I. et Charette, S.J. 2017. Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. *Journal of Microbiological Methods* 138, p. 60-71. doi: 10.1016/j.mimet.2016.02.016.

Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H. et Schleifer, K.H. 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology* 59(5), p. 1520-1525. doi: 10.1128/aem.59.5.1520-1525.1993.

Wagner, N. et al. 2017a. Whey powders are a rich source and excellent storage matrix for dairy bacteriophages. *International Journal of Food Microbiology* 241, p. 308-317. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.037.

Wagner, N., Samtlebe, M., Franz, C.M.A.P., Neve, H., Heller, K.J., Hinrichs, J. et Atamer, Z. 2017b. Dairy bacteriophages isolated from whey powder: Thermal inactivation and kinetic characterisation. *International Dairy Journal* 68, p. 95-104. doi: 10.1016/j.idairyj.2016.12.017.

Watanabe, K. et Takesue, S.Y. 1972. 1972. The Requirement for Calcium in Infection with Lactobacillus Phage. *Journal of General Virology* 17(1), p. 19-30. doi: 10.1099/0022-1317-17-1-19.

Weinbauer, M.G. 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews* 28(2), p. 127-181. doi: 10.1016/j.femsre.2003.08.001.

Weitz, J.S., Hartman, H. et Levin, S.A. 2005. Coevolutionary arms races between bacteria and bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(27), p. 9535-9540. doi: 10.1073/pnas.0504062102.

WetLab. [sans date]. NaCl resistance test. Disponible sur: <http://download.systemsbio.nl/~jasperk/koen/Practical/WetLab/Week1/Wednesday/NaClTest/>.

Whitehead, H.R. et Cox, G.A. 1935. *The occurrence of bacteriophages in starter cultures of lactic streptococci*. Disponible sur: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=The+occurrence+of+bacteriophages+in+starter+cultures+of+lactic+streptococci&author=H.R.+Whitehead&author=G.A.+Cox&journal=New+Zealand+Journal+of+Science+and+Technology&volume=16&pages=319-320&publication_year=1935& [Consulté le: 19 août 2022].

Wiggins, B.A. et Alexander, M. 1985. Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 49(1), p. 19-23.

Williamson, K.E., Radosevich, M. et Wommack, K.E. 2005. Abundance and Diversity of Viruses in Six Delaware Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 71(6), p. 3119-3125. doi: 10.1128/AEM.71.6.3119-3125.2005.

Winkelmann, G. 2007. Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *BioMetals* 20(3), p. 379. doi: 10.1007/s10534-006-9076-1.

Wolfe, B.E., Button, J.E., Santarelli, M. et Dutton, R.J. 2014. Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. *Cell* 158(2), p. 422-433. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.041.

- Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J. et Smit, G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal* 12(2), p. 91-109. doi: 10.1016/S0958-6946(01)00151-0.
- Yeluri Jonnala, Bhagya.R., McSweeney, P.L.H., Sheehan, J.J. et Cotter, P.D. 2018. Sequencing of the Cheese Microbiome and Its Relevance to Industry. *Frontiers in Microbiology* 9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01020> [Consulté le: 6 septembre 2022].
- Yoon, J.-H., Lee, C.-H., Yeo, S.-H. et Oh, T.-K. 2005. 2005. *Psychrobacter aquimaris* sp. nov. and *Psychrobacter namhaensis* sp. nov., isolated from sea water of the South Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55(3), p. 1007-1013. doi: 10.1099/ijs.0.63464-0.
- Yvon, M. et Rijnen, L. 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal* 11(4), p. 185-201. doi: 10.1016/S0958-6946(01)00049-8.
- Zhang, L., Huang, C., Malskær, A.H., Jespersen, L., Arneborg, N. et Johansen, P.G. 2020. The Effects of NaCl and Temperature on Growth and Survival of Yeast Strains Isolated from Danish Cheese Brines. *Current Microbiology* 77(11), p. 3377-3384. doi: 10.1007/s00284-020-02185-y.
- Zheng, J. et al. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70(4), p. 2782-2858. doi: 10.1099/ijsem.0.004107.
- Zomorodi, A.R. et Segrè, D. 2016. Synthetic Ecology of Microbes: Mathematical Models and Applications. *Journal of Molecular Biology* 428(5, Part B), p. 837-861. doi: 10.1016/j.jmb.2015.10.019.