HAL
open science

Ecologie microbienne des biofilms présents à la surface des planches d'affinage en bois de l'AOC "Reblochon de Savoie" et effet inhibiteur vis à vis de Listeria monocytogenes

Claire Mariani

To cite this version:

Claire Mariani. Ecologie microbienne des biofilms présents à la surface des planches d'affinage en bois de l'AOC "Reblochon de Savoie" et effet inhibiteur vis à vis de Listeria monocytogenes. Sciences du Vivant [q-bio]. ENSIA (AgroParisTech), 2007. Français. NNT : 2007AGPT0089 . pastel-00005194

HAL Id: pastel-00005194

https://pastel.hal.science/pastel-00005194

Submitted on 17 Jun 2009

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.

Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires

Ecole Doctorales ABIES
(Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnements et Santé)

THESE

Pour l'obtention du grade de Docteur d'Agro Paris Tech

Mention Sciences alimentaires

Ecologie microbienne des biofilms présents à la surface des planches d'affinage en bois de l'AOC « Reblochon de Savoie » et effet inhibiteur vis à vis de *Listeria monocytogenes*

par

Claire MARIANI

Le 19 mars 2007

Directrice de thèse : Pr. Marie-Noëlle BELLON-FONTAINE

Co-directrice de thèse : Dr. Nadia OULAHAL

JURY

M. Le professeur E. SPINNLER, Agro Paris Tech	Président et Rapporteur
Mme Le professeur C. VERNOZY-ROZAND, ENVL	Rapporteur
Mme Le professeur M.-N. BELLON-FONTAINE, Agro Paris Tech	Examinateur
Mme N. OULAHAL, Maître de conférence, UCBL	Examinateur
M. J.-F. CHAMBA, Directeur régional, ITFF	Examinateur

Avant propos

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une convention Cifre au sein de 3 laboratoires : l'Unité Mixte de Recherche (UMR) 763, Unité de Bioadhésion et Hygiène des Matériaux (UBHM) de l'Institut National pour la Recherche Agronomique (INRA) et AgroParisTech, le Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire (LRGIA) (Equipe d'Accueil EA 3733) de l'Université Claude Bernard Lyon 1, IUT A, à Bourg en Bresse, et le laboratoire Léamil de l'Institut Technique Français des Fromages (ITFF). Il a été financé par l'Association de Coordination Technique pour l'Industrie Agro-alimentaire (ACTIA), l'Association Nationale pour la Recherche Technique (ANRT), le Comité National des Appellations d'Origines Laitière (CNAOL), Entremont-Alliance et l'ITFF.

Je remercie Marie-Noëlle Bellon Fontaine d'avoir accepté d'être ma directrice de thèse et de la confiance qu'elle m'a témoignée en m'accueillant dans son laboratoire.

J'exprime ma vive reconnaissance à N. Oulahal, R. Briandet, JF Chamba et E Notz pour m'avoir guidée tout au long de ce travail, pour leurs conseils avisés et tout l'intérêt qu'ils y ont porté. Ils ont chacun à leur manière su me montrer la voie et me transmettre les valeurs et les qualités d'un chercheur.

Mes plus vifs remerciements vont à C. Vernozy-Rozand et E. Spinnler, qui me font l'honneur de juger ce travail.

Je remercie V. Overney pour m'avoir accueillie au sein de l'ITFF et pour sa confiance concernant les investissements financiers qu'engendrait cette étude.

Je remercie aussi A. Martial, R. Saurel et P. Degraeve pour m'avoir accueillie et soutenue au sein du LRGIA.

Je remercie B. Carpentier et V. Stahl pour leur participation active aux comités de thèse pendant ces 3 années.

Que tous les membres du comité de pilotage soient aussi remerciés pour leur suggestions et remarques : A. Ayerbe, H. Callot, B. Carpentier, C. Cotillon, B. Mathieu, D. Moreau, S. Sermadiras, et V. Stahl.

Je remercie aussi A. Carnet-Pantiez son investissement en temps et en énergie dans le traitement statistique des données.

Je remercie enfin Joseph Paccard et ses fils, Jean-François et Bertrand, pour leur disponibilité, la rigueur avec lesquelles ils ont préparés mes planches, leur patience face à mes questions et mes demandes. Que toute leur famille et leurs employés soient aussi remerciés pour leur accueil chaleureux au cours de ces trois années et le si merveilleux fromage qu'ils produisent !

Dans toutes les structures ou j'ai passé ces trois années, j'ai rencontré de nombreuses personnes qui se sont toutes montrées disponibles et qui m'ont aidée quand j'en avais besoin. Qu'elles reçoivent par ces quelques lignes l'expression de ma gratitude pour les moments partagés :

L'ensemble du personnel du site ITFF à La Roche sur Foron et plus spécifiquement, Corinne, Emmanuel, Julie, Marie-Odile, Marie-Ange, Ludivine, Stéphanie, et Anna,

Toutes les personnes du LRGIA et de l'IUT de Bourg en Bresse. Je pense particulièrement à Anne G, Christelle, Julien, Muriel, Pascal, Issam, Anne C., Amandine, Isabelle, Christine et Marie-Christine, avec une mention spéciale pour Emilie et nos longues discussions

Toutes les personnes que j'ai rencontrées au laboratoire UBHM de Massy : Thierry, Gilles, Jean Marie, Murielle et Florence

Le personnel de l'ITFF à Bourg en Bresse, Monique, Magali, Régine, Christiane et William.

Et les différentes stagiaires qui sont intervenues dans le programme, Rose-Nadine, Jennyfer, Marie et Christine

Je n'aurai jamais pu commencé cette thèse si au cours de mon cursus, des personnes ne m'avaient fait confiance et ne m'avaient épaulé dans des moments critiques : le Pr. Jean-Luc Cadore, le Pr. Bernard Pau, Dr Sophie Ravel et Dr Véronique Lambert. Qu'ils reconnaissent dans ces lignes ma profonde gratitude et reconnaissance pour le temps qu'ils m'ont consacré.

Enfin merci aussi à tous ceux qui n'en avaient cure de mes planches à scier mais qui m'ont écoutée patiemment et soutenue :

Catherine pour sa disponibilité et son écoute qui m'ont toujours éclairé depuis maintenant plus de 20 ans,

Maud, Greg et Lucas pour les moments partagés dans notre maison ouverte aux 4 vents et le soutien qu'ils m'ont offert lorsque j'en avais besoin,

Florence, Anne-Claire, Guylaine et Sébastien et Noah,

Et Jérôme, qui m'a toujours soutenue pendant mes longues études

Je tiens à remercier Aurore, Olivier et Océane pour l'accueil chaleureux dans leur appartement toujours ouvert. Ils ont représenté pendant ces 3 années mon havre de paix parisien.

Mes premières pensées iront cependant à mes parents pour le soutien et les encouragements sans faille au cours de ces 3 dernières années et les 25 autres…

Et Marc, c'est ta gentillesse, ton soutien, et ta patience qui m'ont permis de franchir tous les caps et de difficultés pendant ces trois longues années.

Sommaire

Liste des tableaux ……...p12

Liste des figures …….p15

Liste des abréviations……..p20

Liste des annexes …….....p21

Listes des communications écrites et orales ……..p22

Présentation générale……...……...…...p23

Etude bibliographique :

Chapitre 1 Les fromages et le danger *Listeria* …….....p27

I. Les maladies infectieuses d'origine alimentaires en France, état des lieux et réglementation actuelle pour les produits d'origine laitière…….p27

1. Etat des lieux …….……..p27

2. Réglementation relative à l'hygiène des produits laitiers …….…..p33

II. *Listeria monocytogenes* et listériose ……..…p35

1. Physiopathologie et formes cliniques de la listériose …….…p35

1.1 Etapes de l'infection et pouvoir pathogène…….....p35

1.2 Forme cliniques…….p37

2. *L. monocytogenes*, un germe ubiquiste …….....…p38

3. Présence dans l'environnement agroalimentaire……...….p39

III. Les fromages et le comportement associé de *L. monocytogenes* …….....p41

1. Définition du fromage ……...…p41

2. Etapes de fabrication……...……p42

3. Les différentes catégories de fromages…….....…p43

4. Implication des micro-organismes dans la fabrication et l'affinage ……..p47

4.1 Microflore du lait ……..p47

4.2 Micro-organismes intervenant dans le processus fromager…….…..p47

5. Le comportement de *L. monocytogenes* dans les différentes catégories de fromages p49

Chapitre 2 Désinfection chimique et agents bioactifs d'origine microbienne et laitière pour la maîtrise sanitaire du danger *Listeria monocytogenes* en industrie agro-alimentaire.….p52

I. La désinfection chimique et ses limites……....p52

II. Classification des interactions entre micro-organismes……..p55

III. Les différents mécanisme d'inhibition de *L. monocytogenes*……....p57

1. Diminution de l'adhésion de *L. monocytogenes* aux surfaces ……...….p57

2. Compétition nutritionnelle …….…….p58

2.1 Besoins nutritionnels de *L. monocytogenes* …….....p58
2.2 Cas de compétition nutritionnelle décrits……..p58
2.3 Modélisation de la compétition nutritionnelle……...…p59
3. Molécules inhibitrices ……...……..p60

3.1 d'origine bactérienne……..p60
3.1-1 Acides organiques ……..……p60
3.1-2 Bactériocines ……..p61
3.1-3 Autres molécules: peroxyde d'hydrogène et exo-polysaccharides p64
3.2 d'origine laitière ……....p65
3.2-1 Enzymes …….…p65
3.2-2 Acides gras ……p66
4. Quorum sensing ……..p66

5. Utilisation de bactériophages ……..p67

6. Mécanisme d'inhibition inconnu ou non démontré……p67

Chapitre 3 Le support bois en agro-alimentaire ……p72

I. Structure et principales propriétés du bois ……..…p72

1. Physiologie et structure anatomique ……...p72

2. Composition chimique ……p74

3. Propriétés du bois ……p74

3.1 Propriétés physiques…….……..p75
3.2 Propriétés mécaniques ……...p75
3.3 Propriétés chimiques……..…p75
II. L'utilisation du bois en agro-alimentaire……....p76

1. Historique……p76

2. Propriétés du bois exploitées en agroalimentaire ……p77

2.1 Le bois et la production de vins et boissons alcoolisées : transmission de molécules et interactions bois-bactéries ……..……..p77
2.2 Utilisation du bois pour la production des produits laitiers : régulation de l'humidité, ensemencement en flores technologiques, transmission de molécules ……..……...p68
3. Législation autour du bois……p82

3.1 Textes concernant les matériaux au contact des denrées alimentaires……...p82
3.2 Textes concernant le choix des essences …….....p82
3.3 Textes concernant les produits de traitements du bois …….....p83
3.4 Le « paquet hygiène » ……...…p83

III. Ecologie microbienne du bois……p84

1. Substances anti-microbiennes du bois…….….p84

2. Interactions des microorganismes avec le bois ……...p86

2.1 Contamination naturelle du bois……....p86
2.2 Survie des micro-organismes après contamination artificielle ……p87
2.3 Nettoyabilité du bois étudiée après contamination artificielle ……..p88
3. Ecologie microbienne de la surface du bois ……....p89

3.1 Production de boissons alcoolisées……p89
3.2 Produits laitiers ……..p90
3.2-1 Bois et flores d'intérêt technologique ……....p90
3.2-2 Bois et flores pathogènes …….. p92

Bilan de l'étude bibliographique……..p95

Partie Résultats ……..……..p98

Chapitre 1. Description du cadre de l'étude : l'AOC « Reblochon de Savoie » , processus de production et d'affinage ……...p99

I. Le reblochon de Savoie : description et premiers stades de fabrication……..p99

II. L'affinage du reblochon de Savoir chez l'affineur partenaire……p102

1. Description des caves……...…p103

2. Affinage des fromages…….p105

3. Gestion des planches ……...……p108

III. Les facteurs de variation potentiels de la composition microbienne du biofilm présent sur les planches d'affinage……p112

Chapitre 2 : Dynamique de l'écologie des communautés de micro-organismes des planches en bois au cours de l'affinage des fromages ……..……..….p115

I. Introduction ……..…...p115

II. Matériel et méthodes ……..p117

1. Modalité d'affinage du reblochon chez l'affineur partenaire et choix des caractéristiques des planches à étudier …….....…p117

2. Transport des planches d'affinage étudiées……...p118

3. Méthodologie de prélèvement du biofilm……...…p119

3.1 par la technique des Ultrasons……. ….p119
3.2 par la technique de Brossage ……....p120

4. Détermination des niveaux de population microbienne ……....p120

4.1 Cryoconservation des échantillons ……..…p120
4.2 Dénombrement de la population cultivable sur milieux gélosés……..…p121
4.3 Analyse des consortia par la technique Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) …….....p122
5. Observation microscopique des planches d'affinage ……..…..p123

5.1 Imagerie spectrale confocale_……..…..p123
5.2 Microscopie électronique à Balayage……..…….p123
6. Caractérisation physico-chimique des planches d'affinage…….……..….p123

6.1 Mesure du pH de surface…….…….p124
6.2 Mesure de l'a_w ……..p124
6.3 Détermination du teneur en chlorure de sodium ……..……p124
6.4 Détermination du taux d'humidité ……...p125
7. Analyse des constituants biochimiques du biofilm …….....p125

7.1 par analyse de la suspension de décrochage ……p125
7.2 par spectroscopie infra rouge ……...p126
8. Analyse Statistique…….p127

III. Résultats-Discussion ……...p127

1. Choix méthodologiques, étude de la variabilité des paramètres physico-chimiques des planches et des consortia présents sur les planches …….....p127

1.1 Choix de la méthode de prélèvement des biofilms présents sur les planches d'affinage ……..……....p127
1.2 Choix méthodologique du mode de conditionnement pour le transport des planches …….....p130
1.3 Etude de la variabilité des valeurs physico-chimiques ……...p132
1.3-1 Variabilité intra-empreinte ……..p132
1.3-2 Variabilité intra-planche …….....p133
1.4 Etude de la variabilité inter et intra planche de 4 flores du biofilm……p134
1.5 Etude de la cultivabilité de la FMAR après cryoconservation à –80°C p136
2. Aspects environnementaux (physico-chimique et biochimique) des planches d'affinage ……..……p137

2.1 Courbes de sorption des planches et suivi de l'humidité des planches en caves ……...……p137
2.2 pH, a_w, et taux de sel des planches au stade fin d'affinage…….……p139
2.3 pH, a_w et taux de sel au stade au stade après nettoyage …….…….p142
2.4 Analyse biochimique d'une suspension de décrochage ……..p143
2.5 Etude par spectroscopie infra rouge des composés organiques de la surface des planches ……..p144
3. Description microbiologique du biofilm ……...…p149

3.1 Description microbiologique de stade fin d'affinage ……...p149
3.1-1 Groupes microbiens présents à la surface de planches au stade fin d'affinage en fonction de l'âge des planches. …….….....p150

3.1-2 Groupes microbiens présents à la surface de planches au stade fin d'affinage en fonction de l'origine des fromages. …….....p152
3.1-3 Groupes microbiens présents à la surface de planches au stade fin d'affinage en fonction de la saison. ……...…...p154
3.2 Description microbiologique du stade après nettoyage ……....….p157
3.3 Comparaison des profils des consortia de planches d'affinage aux stades fin d'affinage et après nettoyage par la technique SSCP …….……..p159
3.4 Comparaison des stades de prélèvement par observations microscopiques des biofilms présents sur planches d'affinage ……...…….p162
3.4-1 Microscopie Electronique à Balayage ……...…….…..p163
3.4-2 Imagerie spectrale confocale ……...…….…p165
IV Conclusion ……...p167
Article accepté le 24 novembre 2006 à Journal of Dairy Science…….…….p169

Chapitre 3 : Comportement de *Listeria monocytogenes* inoculée sur des planches d'affinage ……..……..…...p185
I. Introduction ……...p185
II. Matériel et méthodes ……p187
1. Processus d'affinage du reblochon de Savoie ……...……p187
2. Transport des planches d'affinage des caves au laboratoire et préparation des échantillons……..……..p188
3. Préparation de la suspension d'inoculation avec les souches de *L. monocytogenes*.. p191
4. Inoculation et suivi de la population de *L. monocytogenes* sur les échantillons de planche…….……..……p192
5. Décrochage, cryoconservation et dénombrements des consortia présents sur les planches d'affinage ……..…….....p194
6. Caractérisation physico-chimique de la surface des planches d'affinage …….....p194
7. Spectroscopie infrarouge ……..……....p195
8. Analyses statistiques …….....p195
III. Résultats- Discussion ……...……...p195
1. Choix de souches de *L. monocytogenes* ……p195
1.1 Cultivabilité des 5 souches de *L. monocytogenes* après application des ultrasons ……...…….p196
1.2 Suivis des populations sur planche des 5 souches de *L. monocytogenes* …p196
2. Effets des modalités expérimentales sur les caractéristiques physicochimiques des planches et sur le consortium présent sur les planches ……...…..p198
2.1 Influence du mode d'inoculation …….p198
2.1-1 Influence du mode d'inoculation sur les paramètres physicochimiques (a_w, pH) …….…...p198
2.1-2 Calcul de l'apport nutritionnel du TSB 1/20ème ……...p201

2.2 Etude de l'influence de l'autoclavage ……...…….p201
2.2-1 Influence de l'autoclavage sur les paramètres physicochimiques (a_w, pH et humidité) …….....p202
2.2-2 Influence de l'autoclavage sur les profils IRTF des planches ….p206
2.3 Influence du mode d'inoculation et du mode d'incubation sur les microflores du consortium présentes sur les planches d'affinage ……...…p207
3. Etude du comportement des *Listeria* inoculées sur les planches d'affinage au laboratoire ……...…….…….....p210
3.1 Vérification de l'absence de *L. monocytogenes* sur les planches avant l'inoculation ……..p210
3.2 Comportement des 2 souches de *L. monocytogenes* inoculées sur des planches d'affinage ……..……p210
3.3 Influence de l'origine des fromages et du stade de prélèvement sur le comportement des 2 souches de *L. monocytogenes* sur les planches d'affinage …….……..p215
3.3-1 Suivi du comportement de L. monocytogenes après 1 et 12 jours d'incubation en fonction de l'origine des fromages et du stade de prélèvement des planches …….……p216
3.3-2 Cinétique comportement de L. monocytogenes en fonction du stade de prélèvement des planches …….……p219
3.4 Effet du taux de contamination sur le comportement des 2 souches de *L. monocytogenes* sur les planches d'affinage ……..p221
3.4-1 Suivi du comportement de L. monocytogenes inoculée à 3 et 7 Log(UFC/cm²) sur des planches, après 1 et 12 jours d'incubation p221
3.4-2 *Cinétique de L. monocytogenes inoculée à 1 Log(UFC/cm²) sur des planches* ……...…p223
3.5 Comportement de *L. monocytogenes* sur planches d'affinage selon la composition de la suspension d'inoculation …….……p225
3.5-1 Inoculation avec du TSB 1/20ème enrichi avec une suspension de décrochage de planche autoclavée …….……..p225
3.5-2 Inoculation avec de l'eau distillée stérile ……p226
3.6 Inoculation de planches neuves ……...…p228
IV Conclusion……...……p230
Article soumis à Journal of Food Protection le 4 janvier 2007 …….p232

Chapitre 4 : Mécanismes d'action de l'effet anti-*Listeria* des planches d'affinage, premières pistes …….……..p251
I. Introduction ……...……p251
II. Matériel et méthodes ……..……..p252
1. Prélèvement et cryoconservation des consortia issus des planches d'affinage ……p252
2. Souches de *L. monocytogenes* ……..……p253
3. Courbes de croissance de *L. monocytogenes* en modèle planctonique …….p254
3.1 en présence d'une suspension de décrochage filtrées et lyophilisées …....p254

3.2 dans des suspensions de décrochages …….p257
3.2-1 Milieux …….p257
3.2-2 Inoculation et suivi du comportement de L. monocytogenes et de l'évolution des principales flores des consortia ……...p257
3.2-3 Suivi du pH …….…..p258
4. Mise en place d'un modèle de laboratoire pour la reproduction de l'effet anti-*Listeria* sur un support bois …….…p258
4.1 Matériel ……...……p258
4.2 Choix du milieu liquide d'imprégnation et de dépôt ……..p259
4.2-1 Evaluation de l'apport nutritionnel …….p259
4.2-2 Evolution des principales flores dans les milieux liquides testés. p260
4.3 Préparation des faux-fonds, dépôt des consortia et inoculation par *L. monocytogenes* …….….p260
4.3-1 Préparation des faux-fonds …….…….p260
4.3-2 Dépôt des consortia et inoculation par L. monocytogenes ….…p260
4.4 Prélèvement des consortia des faux-fonds ……..p261
4.5 Suivi des paramètres physico-chimiques …….....p261
5. Dénombrements des consortia et de *L .monocytogenes* ……p262
6. Analyses statistiques ……..……...p262
III. Résultats – Discussion ……p263
1. Suivi de *L. monocytogenes* en présence de lyophilisat de suspensions microbiennes prélevées que planches d'affinage filtrées …….……..……p263
2. Comportement de *L. monocytogenes* dans des suspensions de décrochage de planches d'affinage …….…….p266
2.1 Suivi de la population de *L. monocytogenes* dans les suspensions de décrochage …….……..p267
2.2 Evolution du pH dans les suspensions de décrochages ……..p269
2.3 Evolution des principales flores du consortium dans les suspensions de décrochage ……p270
3. Reconstitution du biofilm en laboratoire sur support bois et effet du consortium sur le comportement de *L. monocytogenes* …….p272
3.1 Choix du milieu d'imprégnation des faux-fonds …….p272
3.1-*1 Calcul de l'apport nutritionnel* …….....p272
3.1-2 Suivis de croissance de quatre flores du consortium mis en culture dans les milieux à tester…….p273
3.1-3 Evolution du pH des cultures du consortium dans les 4 milieux à tester…….…….....p275
3.2 Suivi des paramètres physico-chimiques pendant 12 jours à 15°C …...…..p276
3.3 Comportement de *L. monocytogenes* en co-culture avec des consortia réimplantés sur les faux fonds ……...……p277
3.4 Evolution des flores du consortium présentes sur les faux fonds en co-culture pendant 12 jours à 15°C ……...……...……..p279
IV. Discussion……p283

V. Conclusion ……..……p287

Partie conclusion générale et perspectives ……..…….p289

Références bibliographiques …….p298

Annexes …….p318

Résumé …….……..…p366

Abstract……....…..p367

Liste des tableaux

Tableaux de la partie « Etude bibliographique »

Tableau I.1. Estimations du nombre annuel de cas par infection d'origine alimentaire en France métropolitaine dans les années 1990 (D'après Vaillant *et al*., 2004)……..p28

Tableau I.2. Nombre de cas annuels de listériose, et de cas décédés avant la déclaration, identifiés par le Centre National de Référence (CNR) et par le système interactif CNR + Déclaration Obligatoire (DO), en France, entre 1992 et 2003 (D'après Vaillant *et al*., 2004 ; Goulet *et al*., 2005) ……....p30

Tableau I.3. Principales épidémies de listériose survenues depuis 1980 en France et dans d'autres pays, synthèse réalisée d'après le rapport de l'AFSSA (anonyme, 2000c) et des publications postérieures…….…p31

Tableau I.4. Critères microbiologiques applicables aux produits laitiers (n°2073/2005 de la commission du 15 novembre 2005)…….…p34

Tableau I.5. Tonnage et proportion de la production des principales familles de fromage en France en 2004 (CNIEL, 2006)……...p46

Tableau I.6. Survie et croissance de *L. monocytogenes* dans les grandes familles de fromages (D'après Leriche, 2000)…….……..p49

Tableau II.1. Mécanismes d'action des principaux agents antimicrobiens utilisés en IAA et stratégies de résistances des bactéries (D'après Sommer, 1999)…….p53

Tableau III.1. Répartition des différents constituants du bois (CTBA, 1998) ……..p74

Tableau III.2. Liste des matériaux traditionnels utilisés en France pour la préparation, le conditionnement ou l'emballage des produits laitiers (communication personnelle, CNAOL, Syndicat AOC)…….p79

Tableaux de la partie « Présentation des résultats »

Tableau I.1. Caractéristiques de l'air ambiant des 3 principales caves de l'affineur partenaire. …….p104

Tableau II.1. Conditions de dénombrement des flores des suspensions de décrochage..……...p121

Tableau II.2. Comparaison des dénombrements (FMAR, levures et moisissures, et flore halophile) obtenus avec les 2 méthodes de décrochage sur des planches au stade fin d'affinage (Log(UFC/cm²)). …….……..p128

Tableau II.3. Comparaison des dénombrements (FMAR, levures et moisissures, et flore halophile) obtenus avec les 2 méthodes de décrochage, sur des planches au stade après nettoyage (Log(UFC/cm²))……..……...…p129

Tableau II.4. Comparaison des dénombrements (FMAR, levures et moisissures, flore halophile et coliformes) en fonction du conditionnement et avant/après le transport (24 h à température ambiante) (Log(UFC/cm²)). ……..…….…..p131

Tableau II.5. Comparaison des humidités mesurées à la température ambiante avant transport en caves d'affinage et après transport en laboratoire sur des planches prélevées à 2 stades de prélèvement. ……..……..p132

Tableau II.6. Coefficients de variation des valeurs de pH mesurées sur 5 planches de fin de cave 3 (1 empreinte mesurée par planche). …….p133

Tableau II.7. Comparaison de l'a_w et du pH en fonction de l'empreinte sur des planches de fin d'affinage. ……...p134

Tableau II.8. Comparaison des dénombrements de 4 flores en fonction de l'empreinte sur les planches (Log(UFC/cm²))…….p135

Tableau II.9. Coefficients de variation des dénombrements de la FMAR, des levures moisissures, de la flore halophile et des coliformes effectués sur 2 planches de fin d'affinage (4 empreintes et 3 répétitions par empreinte) (Log(UFC/cm²)). ……...p135

Tableau II.10. Comparaison des valeurs physico-chimiques des planches d'affinage en fonction de l'âge des planches (jeune, moyenne, et vieille) et de l'origine des fromages affinées sur les planches (A à H). ……..……....p140

Tableau II.11. Comparaison des valeurs d'a_w, de pH et du taux de sel des planches aux stades fin d'affinage et après nettoyage (brossage et séchage). …….….p143

Tableau II.12. Principaux constituants biochimiques de la suspension de décrochage d'un biofilm de fin d'affinage (60 cm² dans 60 ml de ringer)……...p144

Tableau II.13. Identification des pics de la zone des lipides et des protéines des profils IRTF……..……....p147

Tableau II.14. Identification des pics de la zone mixte et de la zone des sucres des profils IRTF ……..…….....p148

Tableau II.15. Comparaison des dénombrements de 5 groupes microbiens présents sur les planches d'affinage (Log(UFC/cm²)) en fonction de l'origine des fromages affinés sur les planches…….p153

Tableau III.1. Répartition des analyses sur les planches pour un stade de prélèvement (fin d'affinage et après nettoyage) lors du suivi de *L. monocytogenes* à J1, J5, J8 et J12….……..p190

Tableau III.2. Souches de *L. monocytogenes* étudiées ……...……..p191

Tableau III.3. Evaluation de l'apport nutritionnel en mg/cm² de la suspension d'inoculation (2 ml sur 64 cm²). …….p201

Tableau III.4. Evolution des flores minoritaires présentes sur les planches d'affinage de fin d'affinage pendant 12 jours à 15°C et 98% HR. …….….p209

Tableau III.5. Evolution des flores minoritaires présentes sur les planches d'affinage au stade après nettoyage, pendant 12 jours à 15°C et 98% HR. …….....p209

Tableau III.6. Analyse de variance du comportement de *L. monocytogenes* sur planches d'affinage native et autoclavée, après l'affinage de fromages issus de 4 origines (A, B, C et H), avec 2 souches de *L. monocytogenes* (162 et 481) à 2 durées d'incubation (J1 et J12)……....p211

Tableau IV.1. Composition des deux milieux reconstitués : avec du Prolait ou avec du lactosérum. ……..…….….p259

Tableau IV.2. Méthodes de dénombrement des flores des suspensions de décrochage.....…p262

Tableau IV.3. Taux de croissance observés pour les deux souches de *L. monocytogenes* 162 et 481 en milieu TSBye avec ou sans lyophilisat (L. Guillier, Massy)…….p265

Tableau IV.4. Comparaison des apports nutritifs des 3 milieux sur les faux fonds, suite à l'imprégnation (4 ml pour 265 cm²) et au dépôt (1 ml pour 64 cm²), comparativement aux substances nutritives présentes sur planche de fin d'affinage…….……..p273

Tableau IV.5. Apports nutritionnels présents sur une planche de fin d'affinage et sur un faux fond. ...……...p282

Liste des figures

Figures de la partie « Etude bibliographique »

Figure I.1. Schéma des différentes phases de l'infection par *Listeria monocytogenes* (D'après Meylheuc, 2000)……...…….…..p36

Figure I.2. Classification des fromages en fonction des types de fabrication (D'après Lenoir *et al*., 1985)……..p44

Figure II.1. Représentation schématique de la classification de Fredrickson (1977)……p56

Figure III.1. Coupe transversale d'un tronc d'un arbre dont l'aubier est distinct du bois parfait (CTBA, 1998)……..p73

Figure III.2. Schéma des connaissances actuelles des interactions entre les planches en bois, les flores d'intérêt technologique et *L. monocytogenes* (flèches noires) et objectif de la thèse : « étude du comportement de *L. monocytogenes* sur des planches en bois colonisées par les flores d'intérêt technologique » (flèche rouge). …….……..…p96

Figures de la partie « Présentation des résultats »

Figure I.1. Le fromage AOC « Reblochon de Savoie », photo réalisée par le SIR …….…....p100

Figure I.2. Fabrication du reblochon : répartition dans les moules (a) et démoulage (b). Photos réalisées par le SIR …….……..p101

Figure I.3. Reblochons en caves d'affinage sur les rayonnages…….……..p104

Figure I.4. Schéma d'organisation des 3 principales caves avec le trajet des fromages et le système d'humidification …….…….p104

Figure I.5. Les caves d'affinage : voûtées, en briques, recouvertes de chaux …….……....p104

Figure I.6. Reblochons en fin de séchoir, à l'arrivée dans les caves de l'affineur partenaire ……..….p106

Figure I.7. Reblochons en cave d'affinage 1……...……....p106

Figure I.8. Machine à laver les reblochons …….……...p106

Figure I.9. Reblochons emballés entre 2 faux-fonds en épicéa dans du papier paraffiné, et rangés dans des caisses en bois ……..…….…p106

Figure I.10. Evolution du reblochon pendant l'affinage : en fin de séchoir, en fin de cave 1, en cave 2, en fin de cave 3 et à la consommation ……...…..p108

Figure I.11. Planches d'affinage à 3 âges différents : jeune (moins de 4 ans), d'âge moyen (de 4 à 8 ans) et âgée (plus de 8 ans)…….….p109

Figure I.12. Cycle d'utilisation d'une planche d'affinage…….….….p110

Figure I.13. Machine à brosser les planches …….……..…p111

Figure I.14. Séchage des planches en extérieur ……...……...p111

Figure I.15. Schéma du processus d'affinage d'un reblochon fermier et cycles d'utilisation des planches chez l'affineur partenaire : détermination des hypothèses pour les profils microbiens présents sur les planches en fonction du stade d'affinage (D'après Etude Smear Cheese Microflora Projet QLK1-CT-2001-02238 « Biodiversity and anti-Listerial activity of surface microbial consortia from Limburger, Reblochon, Livarot, Tilsit ans Gubbeen cheese). …….…p113

Figure II.1. Caisson de transport avec 2 planches emballées individuellement avec 2 couches de film alimentaire et placées entre 2 autres planches, à la même humidité …….....p119

Figure II.2. Suivi de la cultivabilité d'un consortium décroché par ultrasons et cryoconservé dans du lait glycériné (10%, m/v) à -80°C. ……...p136

Figure II.3. Courbes d'absorption (A) et de désorption (B) des planches d'affinage en fonction de l'âge des planches. Jeune : planche de moins de 4 ans, d'âge moyen : planche de 5 à 8 ans, vieille : planche de plus de 8 ans. (H. Callot, CTBA)……...p138

Figure II.4. Evolution de l'humidité en caves d'affinage 2 et 3 (13°C, 96-97 % HR) de 3 planches d'affinage supportant des fromages de 3 origines (A, L, D)…….……p139

Figure II.5. Comparaison des spectres IRTF normalisés de planches aux stades de fin d'affinage (vert) et après nettoyage (noir), d'une planche neuve (bleu) et d'une croûte de Reblochon de fin d'affinage (rouge), avec un agrandissement des spectres dans la zone d'absorbance 1780-1485 cm^{-1} (protéines) (A. Carnet et I. Adt, LRGIA)…….….p146

Figure II.6. Effet de l'âge des planches sur les dénombrements de la FMAR et de 7 groupes microbiens présents sur les planches d'affinage (Log(UFC/cm²))…….…...……p150

Figure II.7. Effet de l'origine des fromages affinés sur planches (A à H) sur les dénombrements de la FMAR, des bactéries corynéformes, et des levures-moisissures présents sur les planches (Log(UFC/cm²)). ……..…….p153

Figure II.8. Effet de la saison sur les dénombrements de la FMAR et de 7 groupes microbiens présents sur les planches d'affinage (Log(UFC/cm²))……...p155

Figure II.9. Analyse Factorielle de Correspondance Simple (AFCS) des différentes origines en fonction des flores minoritaires dénombrées au stade fin d'affinage lors de l'étude estivale sur 16 planches (2 classes d'âge extrême et 8 origines (A à H))……..……p156

Figure II.10. Effet du nettoyage sur les dénombrements de la FMAR et de 10 groupes microbiens présents sur les planches d'affinage (Log(UFC/cm²)). …….…….p158

Figure II.11. Comparaison des profils SSCP obtenus après amplification par PCR des régions V2 (a) et V3 (b) de l'ARN 16S des bactéries des 4 consortia. A. 2 consortia aux stades fin d'affinage (noir) et après nettoyage (vert ou rouge). B. 2 autres consortia aux stades fin d'affinage (noir) et après nettoyage (vert). ……...p160

Figure II.12. Comparaison des profils SSCP obtenus après amplification par PCR de la région V4 de l'ARN 18S des levures des 4 consortia. A. 2 consortia aux stades fin d'affinage (noir) et après nettoyage (vert ou rouge). B. 2 autres consortia aux stades fin d'affinage (noir) et après nettoyage (vert). ……....p161

Figure II.13. Comparaison des dénombrements de la FMAR et de 10 flores de 2 consortia de fin d'affinage et après nettoyage, origine C, analysés par SSCP (Log(UFC/cm²)) ….……..…p161

Figure II.14. Surface d'une planche d'affinage de fin d'affinage en Microscopie Electronique à Balayage. Fin d'affinage (A : x300 ; B : x1500 ; C : x4000 ; D : x 6000 ; E : x450 ; F : x1300 ; G : x4500), et après nettoyage (H : x350 ; I : x1500 ; J : x4000). (F. Dubois-Brissonnet, UBHM). ……..……..p164

Figure II.15. Surface d'une planche d'affinage par Imagerie Spectrale Confocale. Bois neuf (A, B). Fin d'affinage (C, D). Après nettoyage (E, F). (R. Briandet, UBHM)…….p166

Figure III.1. Protocole expérimental du suivi des *Listeria* après inoculation sur planches d'affinage pendant 12 jours à 15°C et 99% HR. ……..p189

Figure III.2. Schéma du dispositif expérimental d'incubation des échantillons de planches ……...p191

Figure III.3. Schéma et photo du dispositif expérimental d'inoculation des échantillons…. p192

Figure III.4. Un échantillon de planche juste après l'inoculation ……...p192

Figure III.5. Comparaison des dénombrements des 5 souches de *L. monocytogenes* avant et après application des ultrasons (10s, 40kHz) en suspensions dans la chambre de prélèvement. ……...p196

Figure III.6. Evolution des populations de 5 souches de *L. monocytogenes* inoculées sur des échantillons de planches d'affinage après nettoyage et séchage au laboratoire, à 15°C et 98% HR. ..……..p197

Figure III.7. Evolution des paramètres physicochimiques (pH et a_w) des échantillons de planches aux stades avant et après nettoyage avant le dépôt des 2 ml de TSB 1/20ème (flèche), à 5 h après le dépôt (après absorption des 2 ml par la planche), et à 24 h après le dépôt. ……..p199

Figure III.8. Evolution des probabilités de croissance de *L. monocytogenes* à 15°C en fonctions des conditions physico-chimiques des échantillons de planches natives après nettoyage (■) et fin d'affinage (●) à 0, 5 et 24h (Symprevius, Augustin *et al*., 2005). ……...p200

Figure III.9. Evolution de l'a_w (a), de l'humidité (b) et du pH (c) mesurés sur les échantillons natifs (a, b, c) et autoclavés (d, e, f) de planches d'affinage au stade après nettoyage et fin d'affinage (avant nettoyage), pendant 12 jours à 15°C et 98% HR. …….……..…….p203

Figure III.10. Probabilités de croissance de *L. monocytogenes* à 15°C en fonction des conditions physicochimiques mesurées de J-1 à J12 sur les échantillons natifs après nettoyage (a) et fin d'affinage (b) et, autoclavés après nettoyage (c) et fin d'affinage (d) (Symprevius, Augustin *et al*., 2005). ……..p204

Figure III.11. Spectres IRTF normalisés d'échantillons de planches d'affinage de fin d'affinage, natif (bleu) et autoclavé (rouge)…….p207

Figure III.12. Evolution des principales flores présentes sur les échantillons de planches d'affinage au stade après nettoyage (a) et fin d'affinage (b), pendant 12 jours à 15°C et 98%HR ……...……p208

Figure III.13. Comparaison entre les évolutions des souches de *L. monocytogenes* 162 (a) et 481 (b) sur des échantillons natifs et autoclavés de planches au stade après nettoyage pour 4 origines différentes et 2 répétitions, après 1 et 12 jours d'incubation (Log(UFC/cm²)). ……...p212

Figure III.14. Comparaison des évolutions des souches de *Listeria* 162 (a) et 481 (b) sur des planches natives (—♦—) et autoclavées (-■--) dans les premières 24h après l'inoculation (Log(UFC/cm²))……..…….…….p213

Figure III.15. Effet de l'origine des fromages sur les dénombrements (Log(UFC/cm²)) des 2 souches de *L. monocytogenes* décrochés des planches d'affinage après 1 et 12 jours d'incubation (moyenne pour 2 stades de prélèvement et 2 répétitions)…….…p216

Figure III.16. Comparaison des évolutions des souches de *Listeria* 162 (a) et 481 (b) sur des planches avant nettoyage (fin d'affinage) et après nettoyage (moyenne des 4 origines et des 2 répétitions), après 1 et 12 jours d'incubation. (Log(UFC/cm²))……...……p217

Figure III.17. Suivi de la population des *L. monocytogenes*, souches 481 (a) et 162 (b), inoculées à 10^3 Log(UFC/cm²) sur des échantillons de planches d'affinage aux stades fin d'affinage (avant nettoyage) et après nettoyage……p220

Figure III.18. Comparaison entre les évolutions des 2 souches de *Listeria* sur les planches d'affinage après 1 et 12 jours d'incubation en fonction du taux d'inoculation (Log(UFC/cm²). a. Taux d'inoculation à 3 Log(UFC/cm²)) b. Taux d'inoculation à 7 Log(UFC/cm²))……..…p222

Figure III.19. Suivi de la population des *L. monocytogenes*, souches 481 (a) et 162 (b), inoculées à 10^1 Log(UFC/cm²) sur des échantillons de planches d'affinage aux stades fin d'affinage (avant nettoyage) et après nettoyage……..……..…p223

Figure III.20. Comparaison du comportement de la souche *L. monocytogenes* 162 sur des échantillons natifs et autoclavés de planches d'affinage de fin d'affinage (origine C), inoculés avec du TSB 1/20ème et du TSB 1/20ème enrichi en éléments non solubles de la surface de planche autoclavée (60cm² prélevés, centrifugation et reprise dans 2 ml pour une inoculation sur 64cm²)……p226

Figure III.21. Comparaison du comportement de la souche *L. monocytogenes* 481 sur des planches d'affinage (origine C) au stade fin d'affinage (a) et après nettoyage (b), inoculée avec du TSB 1/20ème et de l'eau distillée stérile…….……...p227

Figure III.22. Comportement de la souche *L. monocytogenes* 481 sur une planche d'affinage neuve inoculée avec du TSB 1/20ème (a) et de l'eau distillée stérile (b)…….…..p228

Figure IV.1. Illustration des courbes générées par spectrophotométrie, avec dilutions au demi successives. …….……..p255

Figure IV.2. Illustration du calcul du taux de croissance, à partir des temps de détection estimés en fonction du logarithme du facteur de dilution D. ……....p256

Figure IV.3. Schéma du dispositif expérimental du dépôt des consortia et de la contamination par *L. monocytogenes* sur les faux fonds …….….p261

Figure IV.4. Cinétiques d'évolution des densités optiques (DO) à 600nm à 30°C pour la souche 162 (A) en milieu TSBye (B) et en milieu TSBye + lyophilisat. (C) Détermination du taux de croissance (=pente des droites de régression) de la souche 162 en milieu TSBye (bleu) et en milieu TSBye + lyophilisat (orange) pour l'essai 1 (L. Guillier, Massy). ……....p264

Figure IV.5. Evolution des populations de *L. monocytogenes* (Souches 162 et 481) à 15°C dans des suspensions de décrochage de planches natives (consortium natif) et autoclavées (consortium autoclavé) et du TSB 1/20ème. ……...p268

Figure IV.6. Evolution des populations de *L. monocytogenes* (moyenne pour les souches 162 et 481) à 15°C dans des suspensions de décrochage de planches natives, filtrées (0,45µm) (suspension filtrée) et des suspensions de décrochage autoclavées (consortium autoclavé). ……...p269

Figure IV.7. Evolution du pH à 15°C dans des suspensions de décrochage de planches natives (consortium natif) et autoclavées (consortium autoclavé)……..…….…..p270

Figure IV.8. Evolution de la FMAR, de la flore halophile, des levures-moisissures, des bactéries lactiques et des *Pseudomonas* spp à 15°C dans des suspensions de décrochage de planches natives. ……..…....p271

Figure IV. 9. Evolution de 4 flores (FMAR, flore halophile, *Geotrichum candidum* et levures) d'un consortium mis en culture à 15°C avec un repiquage à 10% (v/v) à 48h dans 4 milieux liquides : milieu reconstitué–Prolait (a), milieu reconstitué–lactosérum (b), lactosérum (c) et TSB (d). ……p274

Figure IV.10. Evolution du pH de culture d'un consortium dans 4 milieux liquides (milieu reconstitué–Prolait, milieu reconstitué–lactosérum, lactosérum et TSB) à 15°C avec un repiquage à 10% à 48h……..…….…p275

Figure IV.11. Evolution des paramètres physico-chimiques de surface des faux fonds pendant 12 jours à 15°C, après inoculation des consortia A et B à J0 (flèche pleine) et dépôt de 2 ml de TSB1/20ème à J2 (flèche en pointillés) : pH (a) et a_w (b)…….…….p277

Figure IV.12. Evolution des 2 souches de *L. monocytogenes* (162 et 481) sur des faux fonds inoculés 48h avant avec des consortia (A et B), pendant 12 jours à 15°C……...…….p278

Figure IV.13. Comparaison des évolution des 2 souches de *L. monocytogenes* (162 et 481) sur des faux fonds en co-culture avec des consortia (A et B) et en culture pure pendant 12 jours à 15°C……..…….…p279

Figure IV.14. Evolution des flores des consortia A (a) et B (b) à la surface des faux fonds après inoculation à J-2 et inoculation des 2 souches de *Listeria* à J0, pendant 12 jours à 15°C. …….……..p280

Figure IV.15. Schéma des connaissances après la thèse sur les relations entre les planches en bois, le consortium inhibiteur et *L. monocytogenes*. Flèches en pointillés : à confirmer……..p294

Liste des abréviations

ACTIA : Association de Coordination Technique pour l'Industrie Agro-alimentaire

AOC : Appellation d'Origine Contrôlée

ATP : Adénosine TriPhosphate

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DO : Densité Optique

FMAR : Flore Mésophile Aérobie Revivifiable

IAA : Industrie Agro-Alimentaire

IRTF : Infra-Rouge à Transformée de Fourier

ITFF : Institut Technique Français des Fromages

LARF : Laboratoire d'Analyses Alimentaires et de Recherche Fromagère

LRGIA : Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

Rep-PCR : Repetitive Extragenic Palindrom Polymerase Chain Reaction

SCM : Smear Cheese Microflora

SDS-PAGE : Sodium Dodécyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism

TIAC : Toxi-Infections Alimentaires Collectives

UBHM : Unité de Bioadhésion et Hygiène des Matériaux

UFC : Unité Formant Colonie

UNIR : Ultra-propre Nutrition Industrie Recherche

Liste des annexes

Annexe 1 : Enquête associée aux prélèvements des planches d'affinage

Annexe 2 : Principes et modes opératoires des 2 technique de prélèvement de consortia présents sur les planches : ultrasons et brossage

Annexe 3 : Milieux de décrochage, de cryoconservation de dénombrement, et de croissance

Annexe 4 : Mesures des paramètres physico-chimiques des planches

Annexe 5 : Norme NF V01 009, 2006 : Hygiène et sécurité des produits alimentaires. Lignes directrices pour la réalisation des tests de croissance microbiologique. Annexe A Caractérisation de la variabilité inter-lots des paramètres physico-chimiques et impact sur la croissance microbienne

Annexe 6 : Compte rendu des travaux réalisés à l'UMR INRA/ENSIA Bioadhésion et hygiène des matériaux pour le Programme ACTIA n°03-27.

Liste des communications écrites et orales

Articles

- Article accepté le 24 novembre 2006 à Journal of Dairy Science

« Biofilm Ecology of Wooden Shelves of the French Raw Milk Smear Cheese "Reblochon de Savoie" »

C. Mariani, R. Briandet, J-F. Chamba, E. Notz, A. Carnet-Pantiez, R.N. Eyoug, N. Oulahal

- Article soumis à Journal of Food Protection le 4 janvier 2007

«Inhibition of *Listeria monocytogenes* by biofilm present on wooden shelves used in cheese ripening »
C. Mariani, N. Oulahal, J-F. Chamba, E. Notz, F. Dubois-Brissonnet, R. Briandet

Communications orales dans des congrès internationaux et nationaux

- Communication orale au colloque de la Société Française de Microbiologie « Interactions bactériennes dans les environnements agro-alimentaires : apport des nouvelles approches », 7 Novembre 2006

« Etude de l'effet anti-*Listeria* par un consortium natif prélevé sur des planches d'affinage de fromages : étude en mode planctonique et en mode biofilm »
C. Mariani, N. Oulahal, R. Briandet E. Notz, M. Gonnet, J.F. Chamba

- Communication orale au « 20th International ICFMH Symposium, FOODMICRO2006, food safety and food biotechnology : diversity and global impact » 29 août au 2 septembre 2006, Italie.

"Anti-*Listeria* activity of natural biofilms present on cheese wooden shelves"
C. Mariani, N. Oulahal, E. Notz, J.F. Chamba, A. Carnet-Pantiez, F. Dubois-Brissonnet, R. Briandet

- Communication orale au « European Seminar on Infrared Spectroscopy » 2 au 4 avril 2006, Lyon

« FTIR spectroscopy applied to wooden shelves biofilms »
C. Mariani, A. Carnet-Pantiez, R. Briandet, J.F. Chamba, E. Notz, N. Oulahal

- Communication orale au « 4th NIZO Dairy conference- Prospects for Health, Well-being and Safety » 15 au 17 juin 2005, Pays Bas .

« Microbial ecology of wooden shelves used in cheese ripening and interactions with *Listeria monocytogenes* "
C. Mariani, N. Oulahal, R. Briandet, E. Notz, JF Chamba, MN. Bellon-Fontaine

Présentation générale

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche de l'Association de Coordination Technique pour l'Industrie Agro-alimentaire (ACTIA) proposé et coordonné par l'Institut Technique Français des Fromages (ITFF). Ce programme (n° 03.27) est intitulé « Ecologie microbienne des planches d'affinage de fromages à croûte lavée, caractérisation du biofilm microbien au cours du cycle d'affinage et interactions vis à vis de *Listeria monocytogenes* ». Ce travail s'inscrit dans la continuité des travaux réalisés dans le cadre de l'association UNIR (Ultra-propre Nutrition Industrie Recherche). Ils ont permis, dès 1997, de développer le concept d'Ecologie Microbienne Dirigée, qui vise à orienter la composition des écosystèmes microbiens dans le but de faire barrière aux flores indésirables (flores d'altération ou pathogènes). Dans le programme ACTIA (n° 03.27), la question principale était la présence d'un biofilm barrière ou positif sur les planches d'affinage en bois. L'enjeu de ce programme pour la filière fromagère est une meilleure connaissance du support bois en fromagerie d'un point de vue technologique et sanitaire. Ce programme qui a commencé en novembre 2003, s'est intéressé plus particulièrement aux planches d'affinage en bois de deux fromages d'Appellation d'Origine Contrôlée (AOC) : le reblochon de Savoie et le munster. Ces 2 productions fromagères ont été choisies comme modèle d'étude en raison des travaux déjà réalisés sur le reblochon par l'ITFF et pour leur représentativité des filières fromagères à croûte lavée utilisant le bois pour l'affinage pour le munster. Ce programme implique 9 partenaires avec un chef de file, l'ITFF, dont le siège est situé à Bourg en Bresse.

Les centres techniques partenaires sont Aérial à Illkirch et le Centre Technique du Bois et de l'Ameublement (CTBA) à Bordeaux.

Deux laboratoires de recherche ont participé à ce programme : l'Unité Mixte de Recherche (UMR) 763, Unité de Bioadhésion et Hygiène des Matériaux (UBHM) de l'Institut National pour la Recherche Agronomique (INRA) et AgroParisTech à Massy, et le Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire (LRGIA) (Equipe d'Accueil EA 3733) de l'Université Claude Bernard Lyon 1, IUT A, à Bourg en Bresse.

Enfin, quatre partenaires professionnels ont aussi été impliqués dans ce programme : le Syndicat Interprofessionnel du Reblochon (SIR) situé à Thônes, le Comité National des Appellations d'Origine Laitière (CNAOL) et Arilait Recherches à Paris, le groupe Entremont-Alliance à Malestroit et MÊTIS-Biotechnologie à Limoges.

Le travail de thèse a été réalisé au sein de 3 laboratoires : à Léamil (ITFF, La Roche sur Foron), au LRGIA EA 3733 (Bourg en Bresse) et à l'UMR 763 UBHM AgroParisTech-INRA (Massy). Les objectif de ce travail de thèse étaient doubles : la connaissance de l'écosystème présent à la surface des planches d'affinage en bois et la réponse à la question : « Les planches d'affinage en bois utilisées en fromagerie, sont elles capables de s'opposer à l'implantation de bactéries pathogènes ? ». L'espèce pathogène sélectionnée dans le cadre de cette étude était *Listeria monocytogenes*, bactérie psychrotrophe parfois à l'origine de sérieuses épidémies d'origine alimentaire. Les planches d'affinage en bois utilisées pour l'affinage du reblochon de Savoie ont été retenues en raison de la proximité géographique des caves d'affinage et des laboratoires de Bourg en Bresse et de La Roche sur Foron. Les planches analysées dans cette étude ont été fournies par la SARL Joseph Paccard, située à Manigod.

Le présent rapport est composé de deux parties. La première est une synthèse bibliographique. Elle porte sur les relations entre *L. monocytogenes* et les aliments, principalement les fromages, la maîtrise sanitaire de cette bactérie pathogène, et l'utilisation du bois en agro-alimentaire. La seconde partie est consacrée à l'exposé des résultats de recherche et leur discussion. Ces travaux ont été réalisés selon deux grandes étapes :

- la description de l'environnement des planches d'affinage en cave d'affinage (ambiance, procédures d'affinage et de nettoyage) et l'analyse de l'écologie microbienne des communautés de micro-organismes présents sur ces planches.

A la suite de mises au point méthodologiques, nécessaires pour analyser l'écologie microbienne d'un support en bois, différents groupes microbiens ont été dénombrés sur la surface de contact planche fromage et des mesures du pH, de l'a_w, et du taux de sel ont été réalisées. Les consortia présents à la surface des planches ont aussi été analysés par la technique Single Strand Conformation Polymorphism et par spectroscopie infra-rouge. Des observations au Microscope

Electronique à Balayage et au Microscope Laser Confocal à Balayage ont été réalisées. Ces travaux sont présentés dans les Chapitres 1 et 2 de la partie résultats

- l'étude du comportement de *L. monocytogenes* après inoculation en laboratoire sur des planches d'affinage spécialement prélevées dans les caves.

Le suivi du comportement des *L. monocytogenes* a été effectué en fonction de différents facteurs : activité microbiologique du biofilm, souches de *L. monocytogenes*, stades de prélèvement des planches, origines des fromages et taux d'inoculation des *L. monocytogenes*. Par la suite, des modèles de laboratoires ont été mis en place pour comprendre le ou les mécanismes d'action de l'effet inhibiteur observé sur les planches d'affinage. Les résultats de ces travaux sont présentés aux Chapitres 3 et 4 de la partie résultats.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 Les fromages et le danger *Listeria*

I. Les maladies infectieuses d'origines alimentaires en France, état de l'art et réglementation actuelle pour les produits laitiers

Les aliments destinés à la consommation humaine peuvent être à la fois de simples vecteurs de micro-organismes, mais aussi des milieux favorables au développement des bactéries. Ce développement peut avoir des conséquences redoutables par leur incidence sur la santé des consommateurs et par les pertes alimentaires occasionnées (Bourgeois *et al*., 1996).

Des techniques ancestrales, toujours utilisées, dont les principes reposent soit sur la destruction de micro-organismes (par exemple la chaleur), soit sur l'inhibition de croissance (par exemple, par acidification ou par réduction de la teneur en eau) permettent de limiter à la fois l'altération des aliments et la croissance des micro-organismes pathogènes. Aujourd'hui, l'évolution des pratiques d'élevage, les nouveaux procédés de fabrication, de distribution et de commercialisation ainsi que les nouveaux produits font apparaître de nouveaux dangers pour le consommateur (Cerf *et al*., 2006).

1. Etat des lieux

Selon le rapport de l'Institut National de Veille Sanitaire (INVS) publiée en 2004 sur la morbidité et la mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire dans les années 1990, en France : « *plus de 200 maladies infectieuses, bactériennes, virales et parasitaires ou toxiques sont transmises par l'alimentation. Les maladies infectieuses d'origine alimentaire se manifestent le plus souvent par une symptomatologie digestive mais également par des syndromes sévères et parfois mortels tels que la méningo-encéphalite à Listeria monocytogenes ou le syndrome hémolytique et urémique (SHU) consécutif à une infection par Escherichia coli producteur de shigatoxine (STEC).* » (Vaillant *et al*., 2004).

Tableau I.1 Estimations du nombre annuel de cas par infection d'origine alimentaire en France métropolitaine dans les années 1990 (D'après Vaillant *et al.*, 2004).

Infections à d'origine alimentaire	Symptômes	Morbidité annuelle d'origine alimentaire	Mortalité annuelle
Bactéries			
Bacillus cereus	Nausées, vomissements et diarrhée	219 - 701	0
Brucella spp.	Fièvre, céphalées, arthralgies, sueurs et asthènie	28 - 132	1
Campylobacter spp.	Diarrhée, douleurs abdominales, vomissements et fièvre,	12 796 - 17 322	13 - 18
Clostridium botulinum	Atteinte bilatérale des nerfs craniens, parlysie flasque	22	0 - 1
Clostridium perfringens	Diarrhée, avec douleurs abdominales et nausées sans vomissements	2 790 - 8 928	2 - 6
Escherichia coli (STEC)	Diarrhée, colite hémorragique, parfois sydrome hémolytique urémique	373 - 747	0 - 1
Listeria monocytogenes	Méningite et septicémie chez l'adulte, avortements	304	78
Salmonella non Typhi	Gastro-entérite aigüe, céphalées, douleurs abdominales, , fièvre	30 598 - 41 139	92 - 535
Salmonella Typhi	Fièvre prolongée, céphalées intenses, anorexie et diarrhée	54	0 - 1
Shigella spp.	Diarrhée, douleurs abdominales, vomissements et fièvre	159 - 233	0
Staphylococus aureus	Vomissements importants et douleurs abdominales, diarrhée, sans fièvre	3 257 - 10 422	0
Vibrio spp.	Gastro-entérites et septicémies	14	1
Yersinia spp.	Diarrhée fébrile, pseudo appendicite	655 - 1 909	4 - 10
Total "bactéries"		**51 269 - 81 927**	**191 - 652**
Virus			
Norovirus	Vomissements, diarrhée, nausées et crampes abdominales	70 194	nd[1]
Virus hépatite A	Fièvre; vomissements, ictère et asthènie	406	2
Total "virus"		**70 600**	**2**
Parasites			
Anisakis simplex	Douleurs abdominales et vomissements	8	0
Diphyllobotrium latum	Troubles digestifs mineurs, douleurs abdominales, diarrhée	3	0
Echinococcus granulosus	Kyste hydatique (tumeur bénigne du foie)	nd[1]	nd[1]
Echinococcus multilocularis	Envahissement des axes vaculaires et biliaires du foie	nd[1]	nd[1]
Fasciola hepatica	Fièvre, douleurs abdominales, hépatomégalie	316 - 357	0 - 1
Taenia saginata	Troubles digestifs bénins, perte de poids, nervosité	64 495	0
Toxoplasma gondii	Asymptomatique, ou fièvre, polyadénopathie ; malformations congénitales		51 655 35
Trichinella spp.	Diarrhée, douleurs musculaires, fièvre et œdème de la face	40	0 - 1
Total "parasites"		**116 517 - 116 558**	**35 - 37**
Totaux agents pathogènes		**238 836 - 269 085**	**228 - 691**

[1] nd : non déterminé

Dans ce rapport, les agents pathogènes pris en compte ont été estimés être à l'origine de 238 836 à 269 085 cas de toxi-infections d'origine alimentaire par an, durant les années 90 (Tableau I.1). Parmi ceux-ci, les infections bactériennes étaient responsables dans la majorité des cas de décès (84 à 94% des 228 à 691 cas pour l'ensemble des agents pathogènes). Les salmonelles, qui représentaient la cause la plus fréquente d'infections bactériennes, étaient aussi la première cause de décès (92 à 535 cas estimés). Les listérioses apparaissaient comme la deuxième cause de décès (78 cas) alors qu'elles n'étaient que la septième cause d'infections bactériennes d'origine alimentaire (304 cas estimés). Le taux de létalité estimé pour les listérioses était donc considérable, de 20 à 30%. Ainsi, bien que le nombre de cas soit faible, la létalité élevée due aux listérioses et à leur potentiel épidémique font de leur surveillance et de leur contrôle dans les industries agro-alimentaires des objectifs prioritaires.

En France, la surveillance des listérioses chez l'homme était assurée depuis 1990 par le Centre National de Référence des *Listeria* (CNR, Institut Pasteur, Paris) et depuis 1998, par le CNR et la déclaration obligatoire (DO). Les résultats de cette surveillance sont reportés dans le Tableau I.2. L'évolution des listérioses (décès, favorable ou incertaine) est recueillie au moment de la déclaration. Pour les formes materno-foetales, sont considérées comme décès toutes les évolutions défavorables de la grossesse (avortement, mort *in utero*, décès post-natal). Ces décès surviennent le plus souvent rapidement après le diagnostic et notés lors de la déclaration. La létalité rapportée pour ces formes est donc proche de la réalité. Par contre, pour les formes non materno-foetales, le décès peut survenir à distance du diagnostic et ne pas être déclaré. La létalité rapportée pour ces formes est donc sous-estimée. A partir de 1998, pour un même système mixte de surveillance, une diminution de l'incidence des listérioses est notable, surtout entre les années 2000 et 2001. Grâce aux efforts conjugués des producteurs, des pouvoirs publics et des autorités sanitaires, l'incidence des listérioses, qui était supérieure à celle des autres pays industrialisés, est passée au même niveau que des pays qui appliquent la tolérance zéro *Listeria* dans les aliments comme les USA. Elle est inférieure à l'incidence de plusieurs pays européens, notamment les pays scandinaves (Goulet *et al*., 2005).

Tableau I.2. Nombre de cas annuels de listériose, et de cas décédés avant la déclaration, identifiés par le Centre National de Référence (CNR) et par le système interactif CNR + Déclaration Obligatoire (DO), en France, entre 1992 et 2003 (D'après Vaillant *et al*., 2004 ; Goulet *et al*., 2005)

Année	1992	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
Identification des cas	CNR	CNR	CNR+DO	CNR+DO	CNR+DO	CNR+DO	CNR+DO	CNR+DO
Nombre de cas materno-fœtaux	213	51	50	66	64	44	55	47
Nombre de décès notifiés	63	21	16	17	23	13	22	13
Létalité	30%	41%	32%	26%	36%	29%	40%	28%
Nombre de cas non materno-fœtaux	225	168	180	204	197	144	165	162
Nombre de décès notifiés	54	40	30	47	28	46	35	26
Létalité	24%	24%	17%	23%	14%	32%	21%	16%
Total des cas	438	219	230	270	261	188	220	209
Total des décès	117	61	46	64	51	59	57	39

Les listérioses se manifestent principalement sous forme de cas sporadiques auxquels viennent se superposer des épidémies, c'est à dire des groupements temporels d'au moins 2 cas de listériose dus à des souches de *L. monocytogenes* ayant les mêmes caractéristiques (rapport de l'AFSSA, anonyme, 2000c). L'existence de plusieurs malades infectés par la même souche de *L. monocytogenes* suggère qu'ils ont été contaminés par le même aliment ou une source commune.

Parmi les aliments identifiés responsables ou suspectés pour les Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC) entre 2001 et 2003 en France, la catégorie des œufs et ovoproduits était la plus importante (18,7% des 1787 TIAC), suivie par les produits carnés (17,2%), les aliments d'origine non animale ou mixte (14%), et les produits de la mer (13,1%) (Delmas *et al.*, 2005). Le lait et les produits laitiers arrivaient en cinquième position (4,4% des TIAC). Lors des principales épidémies de listériose survenues en France et dans d'autres pays, reportées dans la littérature (Tableau I.3), ont été mis en cause des produits laitiers (11 fois), des produits de charcuterie ou carnés (12 fois) des produits de la mer (4 fois) et des produits végétaux (2 fois). Les produits laitiers, et plus particulièrement les fromages, sont donc des aliments sensibles au danger *Listeria*.

Tableau I.3. Principales épidémies de listériose survenues depuis 1980 en France et dans d'autres pays, synthèse réalisée d'après le rapport de l'AFSSA (anonyme, 2000c) et des publications postérieures.

Pays	Année	Nombre de cas	Aliment mis en cause	Niveau de contamination (UFC/g)	Référence
Canada	1980	41	Coleslaw (chou)		Schlech *et al*. 1983
USA	1983	49	**Lait pasteurisé**		Fleming *et al*. 1985
USA	1985	> 142	**Fromage à pâte molle**	10^3-10^4 [1]	Linnan *et al*. 1988
Suisse	1983-87	122	**Fromage à pâte molle**	10^4-10^6 [1]	Bille 1990
Royaume Uni, Irlande	1987-89	> 350	Pâté	10^2-10^6 [1]	McLauchlin *et al*. 1991
USA	1989	10	Crevettes		Riedo *et al*. 1994
Australie	1990	9	Pâté	10^3 [1,2]	Kittson 1992
France	1992	279	Langue de porc en gelée, Charcuterie	10^4-10^6 [1]	Goulet 1993 Rocourt *et al*. 1993
Nouvelle Zélande	1992	2	Moules fumées		Brett *et al*. 1998
France	1993	38	Rillettes	10^1-10^3 [1]	Goulet *et al*. 1998
USA	1994	45	**Lait chocolaté**		Fleming *et al*. 1995
Suède	1994-95	9	Truite fumée	10^2-10^6 [1]	Ericsson *et al*. 1997
France	1995	36	**Fromage à pâte molle**		Goulet *et al*. 1995 Vaillant *et al*. 1998
Canada	1996	2	Crabe	10^9 [2]	Farber *et al*. 2000
Italie	1997	1566	Salade de blé		Aureli *et al*. 2000
France	1997	14	**Fromage à pâte molle**		Jacquet *et al*. 1998
USA	1998-99	101	Hot dog	<0,3 [1,2]	Mead 1999
Finlande	1999	18	Beurre	10^1-10^4 [1,2]	Lyytikäinen *et al*. 1999
France	1999	10	Rillettes	10^3-10^6 [2]	De Valk *et al*. 2000
Royaume Uni	1999	2	**Fromage**		McLauchlin *et al*. 1991
France	1999	32	Langue de porc en gelée		De Valk *et al*. 2001
USA	2000	29	Charcuterie		Anonyme, 2001
USA	2001	13	**Fromage à pâte molle**		MacDonald *et al*. 2005
Japon	2001	38	**Fromage à pâte molle**	10^1-10^7	Makino *et al*. 2005
France	2002	11	Charcuterie	10^2-10^3 [1]	Goulet *et al*. 2005
France	2002	4	Fromage de tête	<10^2 [3]	Goulet *et al*. 2005
USA	2002	44	Charcuterie		Gottlieb *et al*. 2006
France	2003	11	Mortadelle	10^5 [2]	Goulet *et al*. 2005
Suisse	2005	10	**Fromage**	10^1-10^4 [1]	Bille *et al*. 2006

[1]: prélèvements à la distribution, produits non déconditionnés
[2]: prélèvements chez le consommateur, produits déconditionnés
[3]: prélèvements à la production, produits non déconditionnés

Afin d'avoir des informations sur la contamination en *L. monocytogenes* en France des produits réputés sensibles, la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) a mis en place depuis 1993 des plans de surveillance. En 1993-1996 (Note d'information n°1998-44 de la DGCCRF, anonyme 1998), *L. monocytogenes* a globalement été isolée dans 10% des prélèvements réalisés (4500 par an). La fréquence de contamination variait entre 5 et 16% selon les produits. Le niveau de contamination était globalement faible : plus de 90% des produits contaminés avaient moins de 100 *L. monocytogenes*/g sauf pour les produits laitiers (60%). Une hétérogénéité des contaminations existait à l'intérieur de chaque groupe de produit. Pour les produits carnés, les charcuteries consommées en l'état étaient beaucoup moins contaminées (15%) que la viande hachée (36%) ou la charcuterie crue hachée (45%). Ces différences peuvent être expliquées par la cuisson des premiers, traitement listéricide pour une température de 65°C à cœur pendant 2 min. Parmi les fromages, les fromages au lait cru étaient plus fréquemment contaminés (8%) que les fromages au lait pasteurisé (3%). En effet, la pasteurisation du lait peut être une moyen de d'élimination des bactéries pathogènes parmi d'autres. Entre 1997 et 2000, *L. monocytogenes* a globalement été isolée dans 7% des prélèvements réalisés (1000 prélèvements annuels) et même à 5% en 2001 (2000 prélèvements). Cette amélioration était sensible pour chaque catégorie mais plus particulièrement pour les fromages au lait cru à pâte molle, à croûte fleurie ou lavée, dont les fréquences d'isolement sont passées respectivement de 16% à 1%, et de 12% à 5% entre 1993 et 2001. Ces résultats confirment les effets positifs des mesures de maîtrise mises en oeuvres par les autorités et les professionnels (rapport de la DGCCRF sur la surveillance de la contamination par *Listeria monocytogenes* des aliments mis à la distribution de 1997 à 2001, réalisé en 2002, consulté le 31 Octobre 2006 sur le site www. finances.gouv.fr/dgccrf).

2. Réglementation relative à l'hygiène des produits laitiers

La nouvelle réglementation européenne relative à l'hygiène des aliments et à l'alimentation animale ou « paquet hygiène » est entrée en vigueur le 1er janvier 2006. Elle s'appuie sur 6 textes communautaires fondateurs : les règlements n°178/2002, n°183/2005, relatifs à l'hygiène des aliments pour animaux, n°852/2004 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires, n°853/2004 qui fixe les règles spécifiques aux denrées alimentaires, n°882/2004 relatifs aux contrôles officiels et n°854/2004 qui fixe les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels. Le « paquet hygiène » a pour objectif de refondre, harmoniser et simplifier les dispositions qui étaient dispersées dans 18 directives communautaires. Parmi ces nouveaux règlements, le règlement n°2073/2005 de la commission du 15 novembre 2005, paru le 22 décembre 2005 concerne les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. Ses annexes détaillent les critères relatifs aux produits laitiers concernant *L. monocytogenes*, mais aussi *Salmonella*, les staphylocoques à coagulase positive et *Escherichia coli*. Tous les critères concernant les fromages sont détaillés sur le Tableau I.4. Pour *L. monocytogenes*,, même si des différences de risques entre les aliments existent (produits laitiers, produits carnés, végétaux, produits de la mer), le législateur distingue uniquement les denrées qui permettent ou non le développement de la bactérie. L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), dans son avis 2003-SA-0362 du 9 mars 2005, a établi cette classification basée sur l'appréciation des capacités de croissance de *L. monocytogenes* dans les aliments par des tests de croissance et la prise en compte des caractéristiques physico-chimiques des aliments. Pour les aliments qui permettent le développement de *L. monocytogenes*, un seuil de 100 UFC/g (Unité Formant Colonie) a été fixé pour un produit mis sur le marché pendant la durée de conservation, à la condition que le fabricant prouve que le produit ne dépassera pas ce seuil. Cette condition peut être démontrée par la microbiologie prévisionnelle ainsi que par des tests de croissance et de vieillissement.

Parmi toutes les maladies bactériennes d'origine alimentaire, les listérioses possèdent le taux de létalité le plus élevé (20 à 30%) et peut être potentiellement transmise par de nombreux aliments. Dans la partie suivante, les caractéristiques de *L. monocytogenes* à l'origine de ce fort taux de létalité et de sa présence potentielle dans les aliments sont détaillées.

Tableau I.4. Critères microbiologiques applicables aux produits laitiers (n°2073/2005 de la commission du 15 novembre 2005).

Catégories de denrées alimentaires	Micro-organismes/ toxines	Plans d'échantillonnage [1]		Limites [2]		Méthode d'analyse de référence	Stade d'application du critère
		n	c	m	M		
Denrées alimentaires prêtes à être consommées, permettant le développement de *L. monocytogenes*	*Listeria monocytogenes*	5	0	100 ufc/g [3]		EN/ISO 11290-2	Produit mis sur le marché pendant leur durée de conservation
		5	0	Absence dans 25 g [4]		EN/ISO 11290-1	Avant que la denrée alimentaire n'ait quitté le contrôle immédiat de l'opérateur qui l'a fabriquée
Denrées alimentaires prêtes à être consommée, ne permettant pas le développement de *L. monocytogenes*	*Listeria monocytogenes*	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11290-2	Produit mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Fromages, beurres et crèmes fabriqués à partir de lait cru ou de lait traité à une température inférieure à celle de la pasteurisation	*Salmonella*	5	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produit mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Fromages, lait en poudre et lactosérum, visés dans les critères staphylocoques à coagulase positive	Enterotoxines staphylococciques	5	0	Pas de détection dans 25g		Méthode européenne de dépistage du LCR [5] pour le lait	Produit mis sur le marché pendant leur durée de conservation

[1] n= nombre d'unités constituants l'échantillon; c= nombre maximal de résultats pouvant présenter des valeurs comprises entre m et M, pour le nombre d'échantillons rélaisés. [2] m=M. [3] Ce critère est applicable lorsque le fabricant est en mesure de démontrer, à la satisfaction de l'autorité compétente, que le produit respectera la limite de 100 ufc/g pendant la durée de conservation. L'exploitant peut fixer, pendant le procédé , des valeurs intermédiaires suffisamment basses pour garantir que la limite de 100 ufc/g ne sera ps dépassée au terme de la durée de conservation. [4] Ce critère est applicable aux produits avant qu'ils ne quittent le contrôle immédiat de l'exploitant du secteur alimenatire, lorsque celui-ci n'est pas en mesure de démontrer que le produit respectera la limite de 100 ufc/g pendant toute la durée de conservation. [5] Liquide Céphalo-Rachidien

Tableau I.4. Suite

Catégories de denrées alimentaires	Micro-organismes/ toxines	Plans d'échantillonnage [1]		Limites		Méthode d'analyse de référence	Stade d'application du critère
		n	c	m	M		
Fromages à base de lait ou de lactosérum ayant subi un traitement thermique	*E. coli* [2]	5	2	100 ufc/g	1000 ufc/g	ISO 16649-1 ou 2	Pendant le procédé de fabrication, au moment où l'on prévoit le nombre d'*E. coli* le plus élevé [3]
Fromages au lait cru	Staphylocoques à coagulase positive	5	2	10^4 ufc/g	10^5 ufc/g	EN/ISO 6888-2	Pendant le procédé de fabrication, au moment où l'on prévoit le nombre de staphylocoques à coagulase positive le plus élevé. Lorsque des valeurs $>10^5$ ufc/g sont détectées, le lot de fromages doit faire l'objet d'une recherche des entérotoxines staphylococciques.
Fromages à base de lait ayant subi un traitement thermique moins fort que la pasterurisation et fromages affinés à base de lait ou de lactosérum pasterurisés ou ayant subi un traitement plus fort que la pasteurisation	Staphylocoques à coagulase positive	5	2	100 ufc/g	1000 ufc/g	EN/ISO6888	
Fromages à pâte molle non affinés (fromages frais) à base de lait ou de lactosérum pasteurisés ou ayant subi un traitement thermiques plus fort que la pasteurisation	Staphylocoques à coagulase positive	5	2	10 ufc/g	100 ufc/g	EN/ISO6888	Fin du prodédé de fabrication. Lorsque des valeurs $>10^5$ ufc/g sont détectées, le lot de fromages doit faire l'objet d'une recherche des entérotoxines staphylococciques.

(1) n= nombre d'unités constituants l'échantillon; c= nombre maximal de résultats pouvant présenter des valeurs comprises entre m et M, pour le nombre d'échantillons rélaisés. (2) *E. coli* est utilisé ici comme indicateur du niveau d'hygiène. (3) Pour les fromages ne permettant pas le développement d'*E. coli* , le nombre d'*E.coli* est généralement leplus élevé au debut de la période d'affinageet pour les autres il l'est en principe à la fin de la période d'affinage.

II. *Listeria monocytogenes* et listériose

Parmi les différentes espèces de *Listeria* : *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, et *L. monocytogenes*, seule cette dernière est potentiellement pathogène pour l'homme, sauf pour 3 cas de listériose dus à *L. ivanovii* et *L. seeligeri* (McLauchlin *et al*., 2004). Douze sérotypes ont été identifiés chez *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e et 7). En France, les souches isolées de cas de listériose humaine appartiennent le plus souvent au sérotype 4b ou au sérogroupe 1/2 (Rocourt, 1991). Le sérotype 1/2a est le plus souvent isolé dans l'environnement agro-alimentaire (Kathariou, 2002).

1. Physiopathologie et formes cliniques des listérioses

1.1 Etapes de l'infection et pouvoir pathogène

La porte d'entrée est le plus souvent digestive à la suite de l'absorption d'aliments contaminés. Le lieu de pénétration dans la muqueuse digestive est encore mal connu. Les bactéries sont retrouvées dans les plaques de Peyer (système immunitaire) où elles se multiplient. Cette phase est asymptomatique et peut durer de un jour à plusieurs semaines. La dissémination s'effectue ensuite par voie lymphatique vers les ganglions lymphatiques régionaux, puis vers la circulation sanguine. Ce sont les monocytes infectés qui véhiculent les bactéries et les relarguent dans la circulation où elles sont phagocytées par les macrophages de la rate et les cellules de Küppfer (macrophages) du foie. *Listeria* se multiplie alors dans les hépatocytes, ce qui entraîne une réponse inflammatoire intense avec formation de granulomes. *Listeria* infecte ensuite le système nerveux central par voie hématogène, en franchissant la barrière hémato-encéphalique. Elle se développe en surface du cerveau, provoquant une méningite bactérienne purulente, associée à des signes d'encéphalite. L'infection peut aussi toucher d'autres organes, notamment les poumons, l'utérus et l'unité foeto-placentaire (rapport de l'AFSSA, anonyme, 2000c).

Le pouvoir pathogène de *Listeria monocytogenes* dépend donc de sa capacité à pénétrer et se multiplier dans les cellules immunitaires, principalement les cellules phagocytaires. Elle échappe ainsi aux mécanismes de défense de l'hôte et peut être disséminée dans l'organisme. Le caractère

intracellulaire de *Listeria* est donc la base de son mécanisme de défense : après la phagocytose, elle lyse le phagosome et passe dans le cytoplasme des macrophages. Elle passe ensuite d'une cellule à sa voisine par nucléation de filaments d'actine appelé « comète d'actine » (Figure I.1).

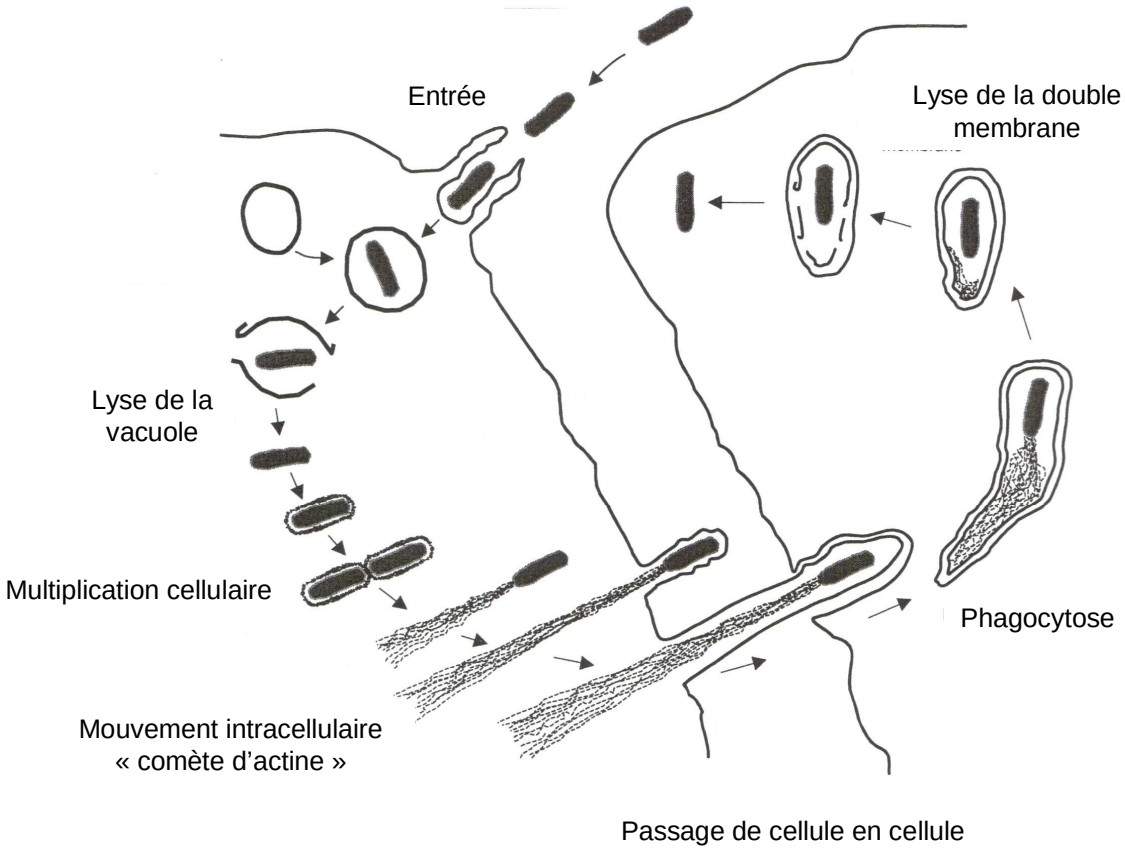


Figure I.1. Schéma des différentes phases de l'infection par *Listeria monocytogenes* (D'après Meylheuc, 2000)

Diverses substances extracellulaires sécrétées par *Listeria monocytogenes* jouent un rôle important dans son pouvoir pathogène (Larpent, 2000). Les fonctions de ces substances sont multiples : adhésion et pénétration des cellules non phagocytaires (Internalines A et B, Protéines de surface p104), stimulation de la phagocytose (Protéine p60, Internaline A), survie dans le phagosome (enzyme membranaire à activité superoxide-dismutase, ClpC serine protéase), lyse du phagosome et passage dans le cytoplasme (listeriolysine O, ClpC ATPase), passage d'une cellule à une cellule adjacente par les listériopodes (ActA) (Doyle, 2001).

1.2 Formes cliniques

Le système immunitaire contrôle la plupart du temps l'infection chez les sujets immunocompétents, qui feront une infection souvent totalement asymptomatique. Cependant, si l'inoculum a été massif ou chez certains sujets fragilisés, femmes enceintes (surtout au 3ème trimestre), patients immunodéprimés (sous chimiothérapie, sidéens) ou présentant des anomalies hépatiques, l'infection n'est pas contrôlée par le système immunitaire au cours de la phase hépatique (rapport de l'AFSSA, anonyme, 2000c). La gravité des infections à *L. monocytogenes* est liée à sa capacité de traverser le placenta ou la barrière hémato-méningée et d'atteindre le fœtus ou le système nerveux central (Farber et Peterkin, 1991). Ainsi, 2 types de formes cliniques peuvent être distingués en fonction de la localisation métastatique de l'infection : la listériose materno-foetale et la listériose de l'adulte (Marth, 1988).

La listériose materno-foetale peut se manifester par des symptômes bénins chez la femme enceinte (syndrome pseudo-grippal) qui contrastent avec la gravité des atteintes du fœtus ou nouveau-né. Les atteintes du fœtus peuvent conduire à des avortements tardifs et une mortinatalité. La listériose néonatale peut être précoce (7 premiers jours post-partum) et prendre la forme d'une septicémie. Cette listériose est mortelle en quelques jours ou entraîne des séquelles neurologiques définitives. La listériose néonatale tardive intervient de quelques jours à quelques semaines après la naissance sous la forme d'une méningite. L'issue est généralement fatale.

La listériose de l'adulte peut présenter différentes formes. Les formes neuro-méningées, atteignant principalement les personnes âgées, sont généralement foudroyantes. Elles se traduisent par des méningites ou des encéphalites. Les formes septicémiques atteignent presque exclusivement les personnes immunodéprimées. Elles peuvent être associées à des pharyngites et mononucléoses, ou des pneumonies. Les formes localisées, cutanées, occulo-glandulaires, cervico-glandulaires sont plus rares (Marth, 1988).

2. *L. monocytogenes* : un germe ubiquiste

L. monocytogenes se distingue de toutes les autres bactéries pathogènes pour l'homme et l'animal par sa possibilité de croissance de -2°C à 45°C (Augustin, 1999), avec un développement beaucoup plus rapide à sa température optimale de croissance (entre 30 et 37°C). Son développement à basses températures (-2 à 4°C) classe cette bactérie parmi les micro-organismes psychrotrophes (Leriche, 2000). Elle n'est pas considérée comme thermorésistante car elle est détruite à 60°C (Bréand *et al*., 1998). *L. monocytogenes* est capable de se multiplier à des pH de 4,6 à 9,6, à l'optimum thermique. Cependant, des variations de croissance ont été observées en fonction de la nature du milieu et de l'acide ainsi que de sa concentration (Pearson et Marth, 1990, Augustin *et al*., 2005). Sa survie a été démontée sur de très longues périodes à des pH proches de pH 4 dans les ensilages de maïs (Ryser *et al*., 1997). Cheroutre-Vialette *et al.* (1998) ont étudié les influences de l'ajout d'hydroxyde de sodium (pH 9) et d'acide acétique (pH 5,6) sur les paramètres de croissance de 3 souches de *L. monocytogenes*, issues de l'environnement agro-alimentaire. Le stress alcalin influençait peu les paramètres de croissance. Le temps de génération est passé de 1,46 h (conditions standards) à 1,8 h et la phase de latence de 1,08 h (conditions standards) à 1,81 h. Par contre, le stress acide a considérablement fait évolué le temps de génération et la phase de latence (6,2 et 6,79 h). Dans cette même étude, le stress osmotique (chlorure de sodium, a_w : 0,95) a aussi influencé le temps de génération (3,42 h) et plus particulièrement la phase de latence (9,78 h). L'activité de l'eau minimale pour la croissance de *L. monocytogenes* varie de 0,90 à 0,92 ou 0,93 si l'a_w est ajusté avec du glycérol, du chlorure de sodium ou du saccharose (Chen et Shelef, 1992 ; Farber *et al*., 1992 ; Miller, 1992). En présence de chlorure de sodium, *L. monocytogenes* ne se développe pas dans des solutions contenant plus de 10 à 11% de chlorure de sodium (Nolan *et al*., 1992 ; Vasseur *et al*., 1999). Toutefois, Farber *et al*. (1992) ont observé des souches pouvant survivre dans des saumures de fromageries contenant 13 à 14% de chlorure de sodium. D'autre part, Lou et Yousef (1997) ont décrit la survie dans une saumure à 25% de chlorure de sodium après un choc thermique de 1h à 45°C. Tous ces résultats permettent de souligner les facultés d'adaptation de *L. monocytogenes* à l'environnement. De plus, les exigences nutritives modérées de cette bactérie (Premaratne *et al*., 1991), son développement possible en aéro-anaérobiose et en micro-aérophilie lui confèrent une capacité de croissance dans de nombreux environnements.

Ainsi, grâce à toutes ces capacités d'adaptation, les *Listeria* sont des micro-organismes ubiquistes, largement distribués dans l'environnement : le sol (Dowe *et al*., 1997), les végétaux, les ensilages (Donald *et al*., 1995 ; Arimi *et al*., 1997), les eaux douces et salées (Farber et Peterkin, 1991), les eaux usées, les litières et les matières fécales (Garcia *et al*., 1996). Ses températures permissives et son aptitude à résister à d'assez fortes concentrations de chlorure de sodium expliquent sans doute largement la survie et la croissance de *L. monocytogenes* dans les aliments, notamment réfrigérés et salés, mais aussi dans les environnements de fabrication des aliments. En effet, cette bactérie a été très souvent isolée dans les environnements agro-alimentaires (Miettinen *et al*., 1999 ; Donnely, 2001).

3. Présence dans l'environnement agro-alimentaire

Portalier (2002) a listé les sources et les modes de contamination du lait et des produits laitiers. Pour le lait, *L. monocytogenes* peut être directement éliminée par le lait des vaches en lactation. Cette excrétion peut être associée à des inflammations mammaires cliniques ou sub-cliniques, ou des listérioses cliniques générales (formes septicémiques, neuro-méningées ou abortives). L'excrétion de *Listeria* dans le lait peut aussi être associée à un portage asymptomatique de la bactérie chez les animaux laitiers. La contamination directe du lait par la mamelle est assez peu fréquente mais la concentration en bactéries peut être très élevée (10^3 à 10^5 UFC/ml de lait de quartier) (Brisabois *et al.*, 1997). Ce mode de contamination du lait est peu fréquent par rapport à la contamination du lait par l'environnement, apparemment plus fréquente. En effet, lors de l'étude réalisée par Sanaa (Sanaa, 1994), l'environnement était à l'origine des contaminations pour 94% des élevages livrant du lait contaminé. La concentration du lait de tank en *L. monocytogenes* était alors faible : 1,5 % des contrôles effectués sur le lait de tank avaient des concentrations supérieures à 5 UFC/ml de lait. Les sources environnementales peuvent être très diverses : principalement la peau des trayons, les bouses, les ensilages et dans une moindre mesure, les lochies (écoulements physiologiques faisant suite au vêlage) et les installations de traite.

Cependant, en plus de cette contamination initiale du lait, les mélanges de lait, le contact avec les instruments et accessoires, le personnel, les surfaces, l'air et l'eau sont autant de sources possibles de contamination, lors de la collecte du lait, de la transformation et du conditionnement

dans les environnements agro-alimentaires. Ainsi, Kerouanton (1999) ont relié les contaminations de l'environnement et des produits en cours de fabrication suite à l'analyse des taux de contamination en *L. monocytogenes* de différents sites fromagers entre 1996 et 1998. En effet, le taux de contamination des fromages en cours de fabrication (10,2%) était supérieur à celui des matières premières (2,8%), pour un taux de contamination de l'environnement de 4,1%.

Dans l'environnement, la formation des biofilms est inévitable en présence d'une surface, de micro-organismes, d'eau et de quelques éléments nutritifs. Un biofilm est une communauté de micro-organismes au sein d'une couche muqueuse adhérant les uns aux autres et (ou) sur des surfaces (Costerton, 1995). L'environnement agro-alimentaire n'échappe pas à ce phénomène (Leriche, 1999). Ainsi, plusieurs campagnes de prélèvements ont permis de détecter la présence des bactéries *Listeria* dans des biofilms de l'environnement fromager au contact ou non avec l'aliment : les sols et les systèmes d'écoulements des eaux (Nelson, 1990 ; Silva *et al.*, 2003), les systèmes de convoyage des produits (Pritchard *et al*., 1995), les machines de production (Menendez *et al*., 1997), les plans de travail (Pritchard *et al*., 1995 ; Salo *et al*., 2006), et les lactoducs (Silva *et al.*, 2003). Parmi ces échantillons positifs, la proportion de *L. monocytogenes* était comprise entre 17% (Menendez *et al*., 1997) et 43,8% (Pritchard *et al*., 1995). En effet, la capacité d'adhésion et de colonisation de *L. monocytogenes* à des surfaces inertes comme le polypropylène, le caoutchouc, l'acier inoxydable est aujourd'hui démontrée (Mafu *et al*., 1990 ; Beresford *et al*., 2001a). Pour l'environnement fromager, une étude spatio-temporelle de la contamination par *Listeria* a été réalisée sur 8 sites de production fromagère au Portugal. Les risques de contamination par *Listeria* étaient présents à toutes les étapes du cycle de production, sans influence de la saison, ni des matériaux en contact avec les fromages, ni de la taille de la fromagerie (Chambel *et al.*, 2007). Des études réalisées sur des ateliers agro-alimentaires de produits carnés ont démontré les influences favorables de certaines conditions d'ambiance (faible température et forte hygrométrie) et de certaines conditions de surface (surface abîmée, présence de matière organique) sur le développement de *L. monocytogenes* (Chasseignaux *et al.*, 2002 ; Thévenot *et al*., 2005).

Enfin, différentes études sur des sites de production fromagère ont démontré la présence de souches de *L. monocytogenes* spécifiques à la filière fromagère, persistantes dans le temps

(Unnerstad *et al*., 1996 ; Leite *et al*., 2006) et bien adaptées à leur environnement (Kerouanton, 1999).

En plus des contaminations initiales ou environnementales, le processus technologique de l'aliment peut aussi influencer la contamination du produit fini. Ainsi, dans la partie suivante, le danger *Listeria* sera discuté en fonction des techniques et des paramètres de fabrication des fromages et des caractéristiques de *L. monocytogenes*.

III. Les fromages et le comportement associé de *L. monocytogenes*

1. Définition du fromage

Le mot fromage vient du latin *formaticum* signifiant qu'il est fabriqué dans une forme appelée moule ou *forma*. Dans d'autres langues, c'est le terme latin *caseus*, signifiant fromage, qui est à l'origine des mots cheese, Käse, queso.

Au plan technologique, le fromage est principalement constitué de caséines, avec des matières grasses, des minéraux et de l'eau dans des proportions variant selon les types de fromages. La norme FAO/OMS n°A-6 (anonyme, 1978, modifiée en 1990) donne la définition suivante :

« Le fromage est le produit frais ou affiné, solide ou semi-solide, dans lequel le rapport protéines de lactosérum/caséine n'excède pas celui du lait, obtenu :

- par coagulation du lait, lait écrémé, lait partiellement écrémé, crème de lactosérum ou babeurre, seul ou en combinaisons, grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulants appropriés, et par égouttage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation,
- par l'emploi de techniques de fabrication entraînant la coagulation du lait et/ou des matières obtenues à partir du lait, présentant des caractères physiques, chimiques et organoleptiques similaires à ceux du produit défini plus haut. »

Selon cette même norme :

- Le fromage « frais ou non affiné » est du fromage qui est prêt à la consommation peu de temps après la fabrication.
- Le fromage « affiné » est celui qui n'est pas prêt à la consommation immédiatement après la fabrication, qui doit être maintenu pendant un certain temps à la température et dans les conditions nécessaires pour que s'opèrent les changements biochimiques et physiques caractéristiques du fromage.
- Le fromage « affiné aux moisissures » est celui dont l'affinage est provoqué essentiellement par la prolifération de moisissures caractéristiques dans la masse et/ou la surface du fromage.

2. Etapes de fabrication

La fabrication des différents fromages détaillée ici est issue de l'ouvrage édité par la Food and Agriculture Organisation (FAO) « Le lait et produits laitiers dans la nutrition humaine » (1995).

Après une éventuelle phase de préparation du lait, qui peut comprendre un traitement thermique, un ajustement des taux de matières grasses et azotées, le lait est tout d'abord coagulé. La coagulation correspond à la floculation des micelles de caséines, principales protéines du lait. Elle peut être réalisée par acidification lactique, sous l'action des bactéries lactiques, ou par action de la présure, avec diverses enzymes protéolytiques, ou par l'action simultanée de l'acidification et des enzymes. Trois grandes catégories de fromages résultent des 3 modes de coagulation : type « pâte fraîche » (par exemple, fromages blancs, petits suisses, cottage) pour une coagulation à caractère lactique, type « pâte pressée » (par exemple, gruyère, cantal, edam) pour une coagulation à caractère présure et type « pâte molle» (par exemple, camembert, munster, bleu) pour une coagulation mixte.

Vient ensuite l'égouttage qui est la séparation du caillé (phase solide) et du lactosérum (phase liquide composée d'eau, et des matières solubles telles que le lactose, les sels minéraux et les protéines solubles). Cette étape a pour objectif une diminution de la teneur en eau par synérèse, phénomène qui résulte de la contraction de la trame protéique du caillé et de l'évacuation du lactosérum. L'égouttage du caillé peut être amplifié par des opérations techniques comme le découpage, le brassage et la cuisson du mélange caillé-sérum, avant le moulage. Le pressage du caillé pour les fromages de type « pâte pressée » participe aussi l'égouttage pendant le moulage.

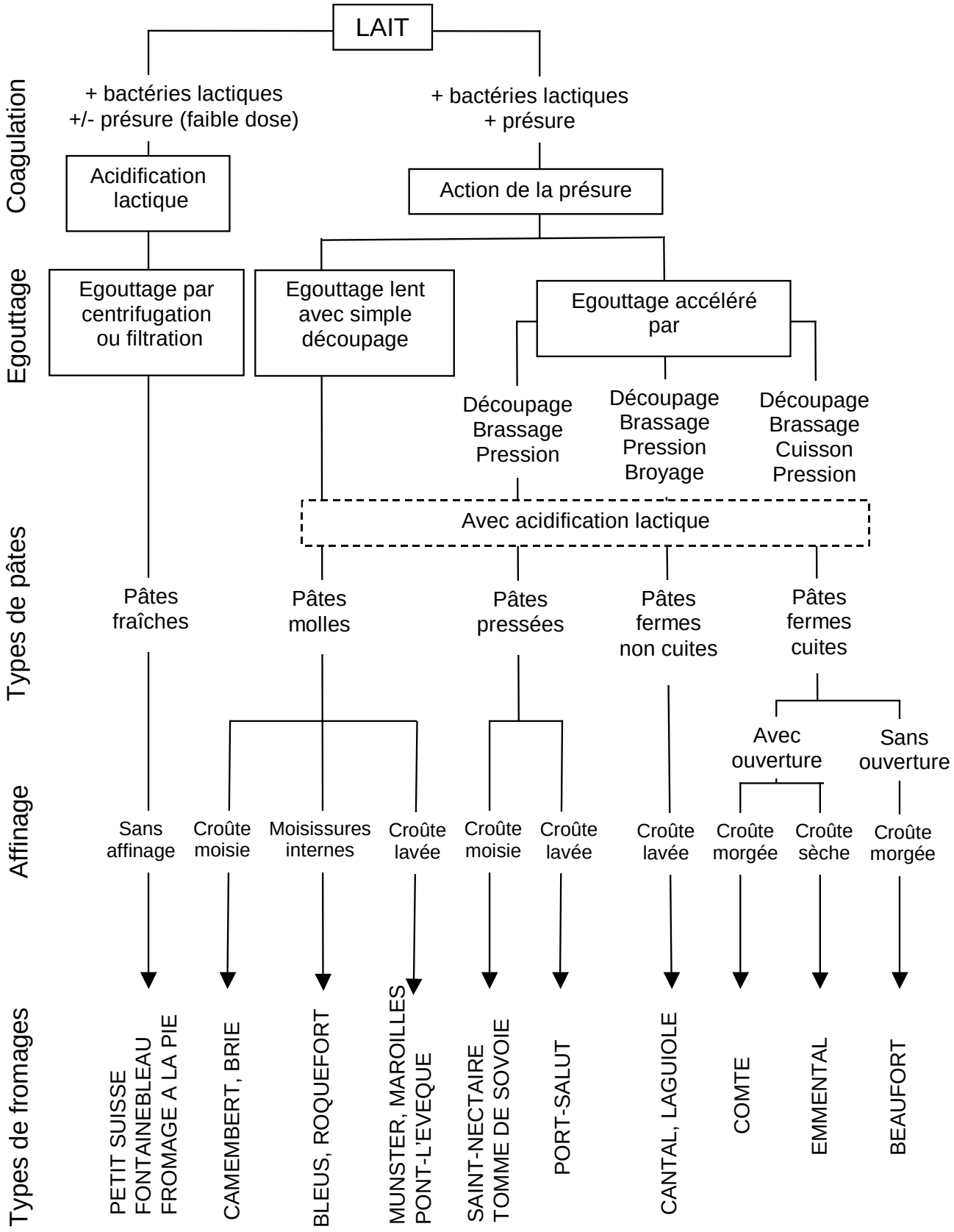
Le salage peut être réalisé dans la masse (salage des grains de caillé avant le moulage), en surface (salage à sec) ou dans un bain de saumure. Il a un triple rôle : (i) il complète l'égouttage et contribue à la formation de la croûte ; (ii) il règle l'activité de l'eau (a_w) du fromage et par là favorise, freine ou oriente le développement des micro-organismes et les activités enzymatiques au cours de l'affinage ; (iii) il relève la saveur du fromage et masque ou exalte le goût de certaines substances formées au cours de l'affinage.

Sauf dans le cas où le caillé est consommé à l'état frais, il subit ensuite un affinage qui correspond à l'ensemble des transformations des composés fermentaires (sucre, lactate, citrate), azotés (protéolyse) ou lipidiques (lipolyse) grâce aux activités microbiennes et enzymatiques. Cet affinage va modifier la composition, la valeur nutritive, la digestibilité et les caractères organoleptiques du caillé (aspect, consistance, saveur, odeur). Il constitue un processus très complexe en raison de la nature des substrats, de la diversité des agents responsables (microflore, enzymes), de la variété des transformations et du nombre de produits formés. Il est dominé par plusieurs phénomènes biochimiques dont les plus importants sont la fermentation des sucres résiduels (lactose et galactose) et des lactates (phénomène entamé dès la phase de salage), et le fractionnement des protéines et de la matière grasse. Les protéines sont divisées en composés de taille de plus en plus réduite : polypeptides, peptides, acides aminés, ammoniac et composés aromatiques. Le fractionnement de la matière grasse est surtout notable dans la cas des pâtes persillées. Les triglycérides sont hydrolysés en acides gras et glycérol, eux mêmes pouvant être transformés en résidus plus sapides et aromatiques (aldéhydes et cétones).

3. Les différentes catégories de fromages

Ainsi, en France, parmi les 400 variétés de fromages obtenus à partir de lait de vache, de chèvre, de brebis et de bufflonne, dix grandes familles de fromages peuvent être distinguées : les pâtes fraîches, les pâtes molles à croûte fleurie, les pâtes molles à croûte lavée, les pâtes persillées, les pâtes pressées non cuites, les pâtes pressées cuites, les fromages fondus, les pâtes filées, les fromages de brebis et les fromages de chèvre. Cette grande diversité est obtenue grâce aux variations de certains paramètres de fabrication (Figure I.2).

Figure I.2. Classification des fromages en fonction des types de fabrication (D'après Lenoir *et al*., 1985)



Les fromages fondus résultent d'une seconde transformation des fromages des types précédents, souvent de la fonte de pâtes pressées cuites ou non cuites. Les fromages fabriqués à partie du lait de chèvre et de brebis sont classés dans deux familles à part car ils peuvent appartenir aux différentes familles de fromages citées plus haut.

Pour les fromages à pâte fraîche, la coagulation a un caractère acide prédominant. Elle est obtenue par un ensemencement du lait avec des bactéries lactiques mésophiles ainsi qu'une faible addition de présure seulement destinée à donner une légère contractilité au caillé. En fin de coagulation, le pH du sérum est bas (4-4,5), le caillé est ferme, friable et perméable. L'égouttage spontané est lent et incomplet, aussi en pratique il est nécessaire d'exercer une pression mécanique sur le coagulum, par un découpage sommaire du caillé et un pressage lors de la mise en sac du caillé et du retournement de ceux-ci. La pâte obtenue en fin d'égouttage se caractérise par une forte humidité (>70%), un pH bas (4-4,2), ce qui lui confère son goût acidulé (Leriche, 2000). Elle contient encore environ 25% du lactose du lait. La consommation s'effectue sans affinage dès la fin de l'égouttage après incorporation éventuelle de crème, de sel, de sucre ou d'épices.

Les fromages à pâte molle sont issus d'une coagulation mixte, par action conjointe de la présure et de l'acide lactique. Les caractéristiques du caillé sont une bonne aptitude à l'égouttage spontané, une friabilité moyenne qui permet des interventions mécaniques accélérant l'égouttage. Les pâtes obtenues après égouttage ont un pH assez bas (4,5-4,8). Par contre après un affinage généralement assez court, le pH est plus haut (6,5-7,5) avec une teneur en eau de 45 à 60% (Leriche, 2000).

Les fromages à pâte pressée ou à pâte ferme se caractérisent par une coagulation de type présure, obtenue par l'utilisation d'une dose élevée de présure dans des conditions favorables à l'action des enzymes (32 à 40°C), avec un temps de coagulation assez court (10 à 30 min). Pour être efficaces, ces traitements doivent être accompagnés d'une acidification très modérée. Le pH en fin d'égouttage est compris entre 4,8 et 5,5. La quasi-totalité du sérum est éliminée au cours du travail en cuve. Le pressage final en moules sert beaucoup plus à former le fromage qu'à l'égoutter. Ensuite, l'affinage se caractérise par la neutralisation progressive de la pâte et une protéolyse par voie enzymatique. Dans les pâtes du type emmental, se développe la fermentation propionique qui, par production de gaz est responsable de l'ouverture, c'est-à-dire la formation

des yeux. Elle contribue aussi au développement de la saveur. Pour les fromages à pâte pressée non cuite, la température des hâloirs est comprise entre 10 et 15°C. Pour les fromages à pâte pressée cuite pour lesquels la fermentation propionique est recherchée, l'affinage se fait à 2 températures : en cave froide (10-12°C) et en cave chaude (20-22°C) pour stimuler la fermentation propionique.

Le reblochon de Savoie est un fromage à pâte légèrement pressée et à croûte mixte : il représente une transition technologique entre les différents fabrications décrites dans la Figure I.2. Il est donc difficilement classable et son processus de fabrication sera détaillé dans le premier chapitre de la partie résultat, lors de la description des caves d'affinage références pour notre étude.

En 2004, environ 10% de la production mondiale de fromage a été réalisée en France (CNIEL, 2006). Les tonnages des principales familles de fromages sont donnés dans le Tableau I.5 pour l'année 2004. La grande majorité des fromages produits sont fabriqués à partir de lait de vache. Parmi ceux ci, deux familles sont prépondérantes à parts égales : les fromages frais et les fromages à pâte pressée, respectivement 38 et 32 % de la production de fromages fabriqués avec du lait de vache.

Tableau I.5. Tonnage et proportion de la production des principales familles de fromage en France en 2004 (CNIEL, 2006)

		Tonnage	% tonnage des fromages au lait de vache	% tonnage tous types de fromages
Fromages au lait de vache	Fromages frais	644205	38	
	Fromages à pâte molle	444776	26	
	Fromages à pâte pressée non cuite	226592	13	
	Fromages à pâte pressée cuite	319335	19	
	Fromages à pâte persillée	36749	2	
	Fromages à pâte filée	31332	2	
Total des fromages au lait de vache		1702989	100	88
Fromages au lait de chèvre		78269		4
Fromages au lait de brebis		56605		3
Fromages fondus		101089		5
Total de la production de fromages		1938952		100

4. Implications des micro-organismes dans la fabrication et l'affinage

4.1 Microflore du lait

Le lait d'un animal parfaitement sain trait aseptiquement, est normalement dépourvu de micro-organismes. Dans le cas d'infections de la mamelle, le nombre de germes augmente peu (sauf en cas de mammites cliniques). Ainsi, hormis les maladies de la mamelle, l'ensemencement du lait se fait pour l'essentiel au cours des diverses manipulations dont il fait l'objet à partir de la traite (FAO, 1995). Ainsi, une étude réalisée par Michel *et al*. (2001) a révélé une diversité importante des différents micro-organismes présents dans les laits crus de vaches prélevés en fin de traite. Des flores d'intérêt technologique ont été retrouvées dans les laits : des flores acidifiantes mésophiles, des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs, des flores halotolérantes, des entérocoques, des bactéries propioniques, des levures et des moisissures. Des flores d'altération ont aussi été retrouvées : des *Pseudomonas* spp, des entérobactéries, des spores de *Clostridium* spp., ainsi que des flores potentiellement pathogènes : *Escherichia coli* à β-glucuronidase positive et des staphylocoques à coagulase positive. En moyenne, les laits analysés renfermaient très peu de germes (moyenne inférieure à 10 000 UFC/mL). Les variations qui concernaient principalement la flore totale et la proportion flore d'intérêt technologique/flore d'altération étaient liées à des pratiques différentes de lavage de matériel de traite et de soins à la mamelle. Cependant, d'autres facteurs pouvaient entrer en compte comme par exemple, l'état général de propreté de l'exploitation, du lieu de traite et des animaux.

4.2 Micro-organismes intervenant dans le processus fromager

Différents micro-organismes, présents dans le lait après la traite ou ensemencés au cours de la fabrication, interviennent dans le processus en se multipliant dans le lait ou le fromage : les bactéries lactiques, les bactéries propioniques, les bactéries corynéformes, les microcoques, les staphylocoques (à coagulase négative), les levures et les moisissures.

Tout d'abord, les bactéries lactiques sont des intervenants majeurs du processus fromager. Elles ont la particularité de synthétiser leur Adénosine TriPhosphate (ATP) grâce à la fermentation lactique des glucides. L'acide lactique est parfois le seul produit terminal (homofermentation).

Dans d'autres cas, à l'acide lactique s'ajoutent de l'éthanol, de l'acétate du lactate et du CO_2 (hétérofermentation). Parmi les cocci, on retrouve les *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc*, et parmi les bâtonnets, les *Lactobacillus* et les *Carnobacterium* (Bourgeois et Larpent, 1996). Ces bactéries assurent une fonction essentielle : elles abaissent le pH en transformant le lactose en acide lactique (*Lactococcus*, Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et Lactobacilles homofermentaires) ou en acide lactique, acide acétique et éthanol (*Leuconostoc* et Lactobacilles hétérofermentaires stricts). Parmi ces bactéries, certaines synthétisent des substances antibactériennes comme les bactériocines ou les acides organiques (Holzapfel *et al*. 1995). Certaines ont aussi la capacité de fermenter le citrate (Bourgeois et Larpent, 1996).

Les bactéries propioniques interviennent surtout dans la formation des yeux des fromages à pâte pressée par fermentation des lactates. En effet, cette fermentation entraîne l'apparition de dioxyde de carbone, qui va former les yeux en cave chaude (22°C) (Bourgeois et Larpent, 1996).

Les bactéries corynéformes, les staphylocoques d'intérêt technologique et les microcoques sont principalement présentes à la surface du fromage. Parmi les bactéries corynéformes, les genres *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* et *Microbacterium* sont retrouvés à la surface des fromages. Les staphylocoques d'intérêt technologique (coagulase négative) sont présents et actifs pour la maturation des fromages dans plusieurs types de production fromagère. La vérification d'absence de danger pour le consommateur est une étape nécessaire pour la sélection des staphylocoques d'intérêt technologique (Chamba et Irlinger, 2004). Parmi les microcoques, *Kocuria varians* et *Micrococcus luteus* jouent un rôle dans l'affinage des fromages de chèvres mais sûrement moins important que le rôle des staphylocoques (Chamba et Irlinger, 2004). Ces 3 flores interviennent dans la coloration de la surface des fromages, principalement les fromages à croûte lavée. Elles interviennent aussi dans les phénomènes de protéolyse et lipolyse, et sont à l'origine de nombreux arômes. Elles peuvent aussi produire de nombreuses substances anti-microbiennes (Chamba et Irlinger, 2004).

De nombreuses levures sont retrouvées à la surface des fromages. Parmi les principales, se trouvent par exemple, *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*. Ces levures jouent un rôle très important de désacidification suite à l'action des ferments lactiques. Des flores acido-sensibles peuvent ainsi se développer sur les fromages (bactéries corynéformes, moisissures). De plus, leurs activités protéolytique et lipolytique ainsi

que leur capacité à produire des arômes sont des propriétés exploitées dans l'affinage de nombreux fromages. Leur développement en surface s'accompagne souvent d'une croûte caractéristique (Chamba et Irlinger, 2004). Les moisissures sont un élément capital de la microflore de certains fromages, avec respectivement deux *Penicillium*, *P. roqueforti* pour les pâtes persillées et *P. camembertii* pour les pâtes molles à croûte fleurie. Outre la coloration et l'aspect caractéristique qu'elles induisent, les moisissures jouent aussi un rôle dans la production d'arômes par leur activités protéolytiques et lipolytiques.

5. Le comportement de *L. monocytogenes* dans les différentes catégories de fromages

Leriche (2000) a classé les grands types de fromage en fonction de leur capacité à permettre ou non la survie et la croissance de *L. monocytogenes* pendant la fabrication et l'affinage (Tableau I.6).

Tableau I.6 Survie et croissance de *L. monocytogenes* dans les grandes familles de fromages (D'après Leriche, 2000).

	Fabrication		Affinage	
	Survie	Croissance	Survie	Croissance
Fromages frais	- (si pH<4,5)	-	NR	NR
Pâtes molles	+	-	+	++
Pâte persillée	+	+	+ (>120 jours)	+/-
Pâte pressée non cuite	+	+	+ (>150 jours)	-
Pâte pressée cuite	+	-	+ (<66-80 jours)	-

NR : Non Réalisé
+ : Conditions favorables à la croissance ou la survie
- : Conditions défavorables à la croissance ou la survie

Les fromages frais qui possèdent un pH acide, inférieur ou égal à 4,5 ne permettent pas la croissance voire la survie de *L. monocytogenes* (Leriche, 2000).

Les fromages à pâte pressée cuite contiennent dans leur procédé de fabrication une étape de chauffage du caillé à 50-55°C et parfois un affinage favorisant la fermentation propionique. L'étape de chauffage en cuve, la production de lactate et le salage en début de vie du fromage, puis la teneur croissante en acétate et en propionate pendant l'affinage conduiraient à la disparition de *L. monocytogenes* (Buazzi *et al*., 1992 ; Ryser, 1999).

Pour les fromages à pâte persillée, Papageorgiou et Marth (1989) ont suivi l'évolution de *L. monocytogenes* pendant la fabrication. Suite à une phase de croissance, la bactérie cesse de se développer dès que le pH devient inférieur à 5. Ensuite, pendant les 2 premiers mois de stockage, la population de *Listeria* chute d'un facteur 2 à 3 en raison de la formation d'acides gras libres et d'acides gras de chaîne moyenne, par *P. roqueforti*. Dans les 2 mois suivants, *L. monocytogenes* est toujours présente mais ne se multiplie pas. La présence de cétones, d'acides gras ainsi qu'une forte teneur en chlorure de sodium pourraient inhiber la croissance de *L. monocytogenes*.

Pour les fromages à pâte pressée non cuite, Yousef et Marth (1988), ont noté une augmentation de la population de *Listeria* après le pressage, qui résulte d'un effet de concentration et d'une croissance bactérienne. Pendant les 40 premiers jours d'affinage, le nombre de *Listeria* est stable puis diminue régulièrement. La concentration finale en *L. monocytogenes* dépend de la souche étudiée, du taux d'inoculation, du temps de conservation et de la teneur en eau du produit. Des résultats comparables ont été obtenus sur des fromages de type gouda et maasdam (Ryser, 1999).

Pour Ryser (1999), l'élévation de pH en surface des fromages à pâte molle (croûte fleurie ou croûte lavée) crée des conditions favorables au développement de *L. monocytogenes*. En effet, Ryser et Marth (1987) ont montré que pendant l'affinage de fromages de type camembert, *L. monocytogenes* commençait à se multiplier dès que les valeurs de pH s'élevaient au dessus de 5. Cependant, pour Canillac et Mourey (1993), il n'y a pas de corrélation entre le pH et la quantité de *Listeria* spp. sur le produit fini.

Deux études ont estimé la présence de *L. monocytogenes* dans des fromages suisses. La première décrite par Pak *et al*. (2002), a été réalisée entre 1990 et 1999 sur un total de 86 271 échantillons de fromages suisses, prélevés en usine ou en cave d'affinage. *L. monocytogenes* a été détectée dans 7,4 % des échantillons de fromages à pâte dure (hard ou semi-hard cheese), dans 1,3% des échantillons de fromages à pâte molle, et dans 4,7 % pour les échantillons de fromages non déterminés. Les prévalences de la deuxième étude, décrite par Hummerjohann *et al*. (2005), sont

légèrement plus faibles : 4% des 3555 échantillons de fromages à pâte extra dure, 2 % des 2290 échantillons de fromages à pâte dure, et 1% des 538 échantillons de fromages à pâte molle. Cette étude a été effectuée sur l'année 2003. Ainsi, dans cette étude, *L. monocytogenes* apparaît moins présent dans les fromages à pâte molle que les fromages à pâte dure, même si les fromages à pâte molle offrent des conditions plus favorables au développement de ce pathogène. Dans une troisième étude, Rudolf et Scherer (2001) ont évalué la prévalence de *L. monocytogenes* dans 329 échantillons de fromages européens, en 1999. *L. monocytogenes* a été détectée dans 6,4% des échantillons. La prévalence de *L. monocytogenes* variait en fonction du pays : Italie (17,4%), Allemagne (9,2%), Autriche (10%) et France (3%). *L. monocytogenes* n'a pas été isolée dans les échantillons suisses. Dans cette étude, les fromages à pâte molle étaient plus contaminés que les fromages à pâte dure (13,3% et 4,4%). Les fromages au lait pasteurisé étaient plus contaminés que les fromages au lait cru (8,0% et 4,8%), phénomène imputable aux contaminations des fromages pendant la fabrication.

Parmi les points importants mis en avant dans ce chapitre, il faut retenir la gravité des symptômes des listérioses, qui rendent cette maladie importante à maîtriser. De nombreux produits laitiers peuvent transmettre cette maladie si les conditions de fabrication ne sont pas maîtrisées d'un point de vue sanitaire. Les étapes de fabrication et les caractéristiques physico-chimiques et biochimiques permettent un contrôle ou dans certains cas une disparition de la bactérie dans les fromages. Néanmoins, le caractère ubiquiste de *L. monocytogenes* nécessite une maîtrise sanitaire de cette bactérie dans l'environnement agro-alimentaire. L'élimination et le contrôle sanitaire de *L. monocytogenes* dans les environnements agro-alimentaires laitiers restent donc des objectifs prioritaires.

Chapitre 2 Désinfection chimique et agents bioactifs d'origine microbienne et laitière pour la maîtrise sanitaire du danger *Listeria monocytogenes* en industrie agro-alimentaire

Une classification des techniques de préservation alimentaire contre les micro-organismes indésirables, pathogènes ou d'altération, distingue les techniques anciennes (hautes températures, salage, acidification, séchage, protection chimique) des techniques récentes : par inactivation non thermique (hautes pressions, champs électriques pulsés), par l'emballage (atmosphère modifiée ou emballages actifs), par des composés antimicrobiens naturels (chitosane, huiles essentielles, bactériocine, lysosyme par exemple) et par des micro-organismes bioprotecteurs (Devlieghere *et al*., 2004). Dans le premier chapitre, l'influence des paramètres physico-chimiques des fromages (séchage, acidification) a été abordé comme moyen de limiter de développement de *L. monocytogenes*. Le chapitre présent s'intéresse dans un premier temps à la désinfection chimique et ses limites puis plus particulièrement aux mécanismes anti-*Listeria* liés aux interactions microbiennes, avec des exemples issus de l'environnement laitier lorsqu'ils étaient disponibles. Une attention particulière est portée aux phénomènes siégeant à la surface des fromages. De même, les composés antimicrobiens non bactériens d'origine laitière ont été détaillés.

I. La désinfection chimique et ses limites

En Industrie Agro-Alimentaire (IAA), la maîtrise sanitaire de *L. monocytogenes* est classiquement assurée par la désinfection chimique. Elle fait suite à une opération de nettoyage qui vise à éliminer les souillures et les résidus organiques. Elle a pour objectif détruire les micro-organismes encore présents sur la surface ou remis en suspension par le nettoyage.

L. monocytogenes est sensible à différents agents couramment utilisés en IAA, tels que les dérivés chlorés, les dérivés iodés, ou les ammoniums quaternaires, lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations respectives de 100 ppm, 25-45 ppm et 100-200 ppm (Lopes, 1986 ; Orth et Mrozeck, 1989). Des agents oxydants (ozone, eau oxygénée, acide péracétique) et des aldéhydes (formaldéhyde et glutaraldéhyde) peuvent aussi être utilisés en IAA. Les mécanismes d'action des principaux agents microbiens et les mécanismes de résistance des bactéries sont présentés dans le Tableau II.1.

Tableau II.1. Mécanismes d'action des principaux agents antimicrobiens utilisés en IAA et stratégies de résistances des bactéries (D'après Sommer, 1999)

Agent anti-microbien	Cible	Mécanisme de résistance
Ammoniums quaternaires	Augmentation de la perméabilité de la membrane, Action détergente, Perturbation des voies enzymatiques	Entrée minimisée, Expulsion accrue (efflux par transporteurs spécifiques), Modification de la composition pariétale, Présence d'exo-polysaccharides
Chlore	Inhibition des voies métaboliques (action sur ATP-synthétase et déshydrogénase), Cassure de l'ADN	Mécanisme de résistance à un stress oxydatif : catalase, hyperoxyde réductase
Aldéhydes	Action sur les groupements $-NH_2$	Modification de la composition pariétale, Présence d'une aldéhyde déshydrogénase

D'après de nombreuses études dont celle de Best *et al*. (1990), la présence de matières organiques (lait, sérum, matières grasses) rend la plupart des agents désinfectants inefficaces. Ce point souligne l'importance de la phase de nettoyage préalable dans les IAA. Toutefois, la combinaison de glutaraldéhyde et d'ammoniums quaternaires tensio-actifs permet de lever l'inhibition liée aux matières grasses. Parmi toutes les molécules testées, certaines sont peu affectées par les protéines : le gluconate de chorhexidine et le glutaraldéhyde. En revanche, ces molécules se révèlent inefficaces en présence de matières grasses. Parmi les molécules les plus bactéricides, la monolaurine (monoester d'acide laurique) est la plus efficace envers *L. monocytogenes* en présence d'acide lactique à 18 mM (Oh et Marschall, 1994) ou en solution alcaline à pH 10,5 avec du chlorure de sodium à 10% (m/v) (Vasseur *et al*., 1999).

Les phénomènes de résistances aux principaux désinfectants chimiques peuvent être liés à des mécanismes intrinsèques aux bactéries ou au mode biofilm. Ainsi, la résistance accrue de *Listeria* présente dans les biofilms aux produits de désinfection tels que l'ozone, les dérivés chlorés, les péracides, le péroxyde d'hydrogène, le trisodium phosphate et la monolaurine a été démontrée (Lee et Franck, 1991 ; Wirtanen et Mattila-Sandholm, 1992 ; Somers *et al*., 1994 ; Oh et Marshall, 1994 ; Fatemi et Franck, 1999 ; Norwood et Gilmour, 2000 ; Somer et Wong, 2004 ; Robbins *et al*., 2005). La combinaison d'un traitement successif à la soude puis à l'acide acétique appliqués à 55°C semble la plus efficace pour détruire *L. monocytogenes* dans les biofilms (Arizcun *et al*., 1998). De nombreuses explications sont avancées dans la littérature pour expliquer la résistance accrue des bactéries en biofilm : la synthèse d'exo-polysaccharides qui réduirait l'accessibilité des molécules, la stabilisation du micro-environnement bactérien par la présence du glycocalix (stabilisation des variations pH, rédox, conditions ioniques), les modifications physiologiques des bactéries qui réduiraient leur sensibilité aux désinfectants, la synthèse d'enzymes de dégradation (Sommer, 1999).

La résistance aux désinfectants peut être aussi spécifique à certaines souches de *Listeria*. Mereghetti *et al*. (2000) ont démontré la résistance intrinsèque de 7 souches de *L. monocytogenes* sur 97 souches non répertoriées, à des ammoniums quaternaires (cetrimide et chlorure de benzalkonium). Dans une autre étude, réalisée par Aase et al. (2000), 4 % des *L. monocytogenes* isolées de l'environnement agro-alimentaire pouvaient se développer en présence de chlorure de benzalkonium (Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de 3 µg/ml) et 13 % étaient résistants (CMI de 4-7 µg/ml). L'exposition répétée aux ammoniums est aussi à l'origine de l'adaptation des *Listeria* et de l'apparition de résistance par expulsion accrue de ces molécules par des transporteurs spécifiques (To *et al*., 2002). Cette résistance par transporteurs peut être réversible (réponse au stress) ou acquise de manière plus définitive. La mise en évidence de résistances croisées entre les désinfectants mais aussi entre les désinfectants et les antibiotiques font des bonnes pratiques de nettoyage et désinfection un enjeu majeur pour la maîtrise sanitaire des surfaces et des environnements des industries agro-alimentaires (Langsrud *et al*., 2003).

Ainsi, les phénomènes de résistance, liés au mode biofilm ou aux bactéries elles mêmes, démontrent les limites de la désinfection chimique et la nécessité de leur associer d'autres barrières pour maîtriser cette bactérie dans l'environnement agro-alimentaire et assurer la

sécurité sanitaire des aliments. Parmi ces barrières, l'inhibition par d'autres bactéries peut être envisagée. En effet, dans l'environnement de petites industries laitières où les opérations d'hygiène ne sont pas forcément intensives, permettant le maintien d'une flore résidente, aucune *Listeria* ni *Salmonella* n'a pu être isolée par Cosentino et Palmas (1997). Ce résultat est en faveur d'un frein à la croissance de ces 2 bactéries pathogènes par la flore résidente des ateliers étudiés.

II. Classification des interactions entre micro-organismes

James *et al*. (1995) regroupent les interactions entre deux espèces bactériennes en différentes catégories :

- l'ammensalisme, lorsqu'une bactérie synthétise des molécules inhibitrices, telles des bactériocines, vis-à-vis de l'autre bactérie,

- la compétition, lorsque certains éléments nutritifs indispensables à la croissance des deux micro-organismes sont limités,

- le commensalisme, lorsque la présence d'un micro-organisme favorise la croissance d'un deuxième micro-organisme,

- la protocoopération, lorsque chacune des deux espèces bénéficie de la présence de l'autre,

- le neutralisme, lorsqu'il n'existe aucune interaction entre les deux bactéries.

Dans une communauté mixte telle que celle des biofilms pluri-microbiens, les interactions entre les différentes espèces microbiennes peuvent être très complexes, et regrouper une ou plusieurs interactions citées ci-dessus.

Fredrickson (1977) a proposé une autre classification en fonction du mécanisme biologique impliqué. Il a distingué les interactions directes des interactions indirectes (Figure II.1). Les interactions directes impliquent obligatoirement un contact physique entre les individus. Fredrickson (1977) limite les interactions directes au parasitisme et à la prédation, qui sont surtout étudiées en écologie animale. Pour les micro-organismes, l'interaction bactériophage –

bactérie cible peut être classée parmi les interactions directes. Pour une interaction indirecte, l'effet de A sur B se décompose en une modification du milieu extérieur par A et l'effet de cette modification sur B. Le milieu extérieur peut être impliqué selon des mécanismes très divers : modification d'un paramètre physico-chimique, compétition pour l'adhésion à un support, ou production/élimination d'une substance. Parmi les interactions indirectes, une grande majorité implique une substance présente dans le milieu extérieur. Une classification a été proposée par Cornu (2000). Si cette substance est un substrat du métabolisme de l'une au moins des populations, alors il s'agit d'interactions trophiques. Si cette substance n'est pas métabolisable par les 2 populations mais est produite par une des 2 populations avec un effet positif ou négatif sur la croissance de l'autre, alors il s'agit d'une interaction de type interférence. Les différentes interactions directes ou indirectes impliquant *L. monocytogenes* sont détaillées dans la partie suivante.

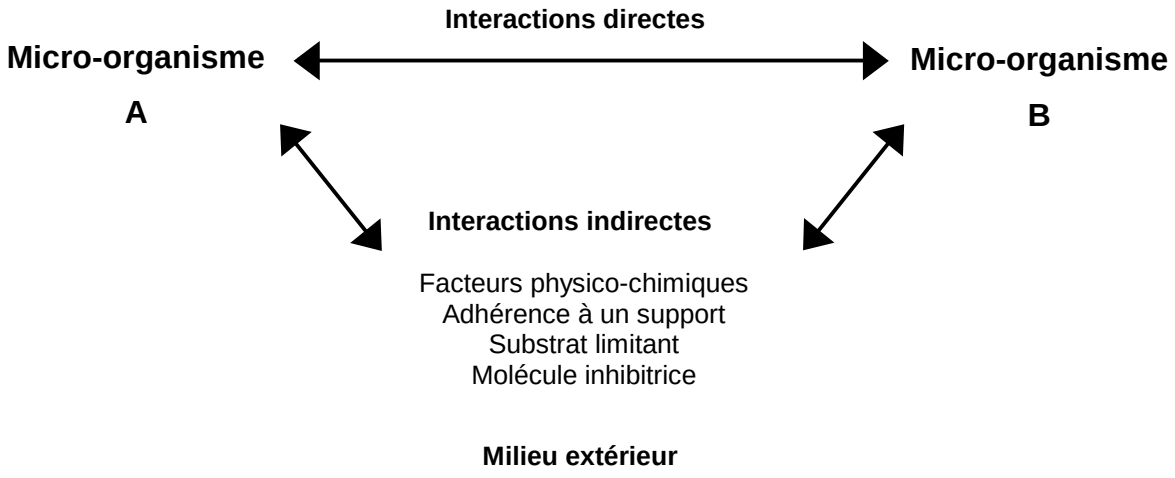


Figure II.1 Représentation schématique de la classification de Fredrickson (1977).

III. Les différents mécanismes d'inhibition de *L. monocytogenes*

1. Diminution de l'adhésion de *L. monocytogenes* aux surfaces

Le processus de formation d'un biofilm peut être séparé en 2 phases distinctes : l'adhésion et la prolifération des cellules (Takhistov et Georges, 2004). L'adhésion s'effectue par l'intermédiaire d'interactions physico-chimiques, qui dépendent des propriétés physico-chimiques des surfaces des 2 corps en présence. Après une consolidation de position par l'intermédiaire d'organites extracellulaires (flagelles, pili) ou par les synthèses de polymères extracellulaires, les cellules pourront se multiplier pour former une association de cellules et de matrice organique communément appelée biofilm (Briandet, 1999).

La capacité de *L. monocytogenes* à adhérer rapidement à des surfaces inertes au contact alimentaire comme le polypropylène, le caoutchouc, l'acier inoxydable et le verre est maintenant bien établie (Mafu *et al*., 1990 ; Beresford *et al*., 2001a). Cependant, l'adhésion de *Listeria* dépend de la souche (Norwood et Gilmour, 1999 ; Harvey *et al*., 2007), de l'état physiologique de la bactérie (Briandet *et al*., 1999 ; Dykes, 2003 ; Tresse *et al*., 2005) de la nature du support (Mafu *et al*., 1991 ; Sinde et Carballo, 2000 ; Hilbert *et al*., 2003), et du milieu environnant (Vatanyoopaisarn *et al*., 2000 ; Folsom *et al*., 2006 ; Tresse *et al*., 2005). L'implication des interactions physico-chimiques entre les surfaces des micro-organismes et du substratum a été démontrée (Busscher *et al*., 1984). Ainsi, une modification des caractéristiques de la surface peut modifier l'adhésion bactérienne. Cette modification peut être réalisée par un simple traitement de nettoyage (Boulangé-Petermann *et al*., 1995), l'adsorption de molécules (Van Oss, 1996) et la présence d'un biofilm (Briandet *et al*., 2001).

Meylheuc *et al*. (2006) ont démontré que des surfaces adsorbées avec des surfactants produits par des bactéries issues d'aliments, *Pseudomonas fluorescens* (flore de surface de feuilles de salades) et *Lactobacillus helveticus* (ferment de pâte pressée cuite) réduisaient l'adhésion de 4 souches de *Listeria monocytogenes* de 75 à 99%, sur de l'acier inoxydable. Al-makhlafi *et al*. (1994) ont aussi démontré que la présence de α-lactalbumine et β-caséine n'influençait pas l'adhésion de *L. monocytogenes* Scott A sur des surfaces de silice, alors que la présence de β-

lactoglobuline augmentait significativement l'adhésion. Sur acier inoxydable, Barnes *et al*. (1999) ont démontré que l'adsorption de lait écrémé (2h à 20°C) réduisait de 30 fois l'adhésion de *L. monocytogenes,* tout comme l'adsorption des protéines du lait (0,5 mM) : α-caséine, β-caséine, κ-caséine et α-lactalbumine. Les mécanismes mis en jeu pour expliquer la réduction d'adhésion sont la mobilité des chaînes protéiques et l'encombrement stérique.

2. Compétition nutritionnelle

2.1 Besoins nutritionnels de *L. monocytogenes*

D'après Premarante *et al*. (1991), les facteurs de croissances nécessaires à *L. monocytogenes* Scott A sont la leucine, l'isoleucine, l'arginine, la méthionine, la valine, la cystéine, la riboflavine, la biotine, la thiamine et l'acide thioctique, ainsi que le fer ferrique (Fe^{3+}). Le glucose et la glutamine sont aussi nécessaires comme source de carbone. Néanmoins, le glucose peut être remplacé par du fructose, du mannose, du cellobiose, du tréhalose, du maltose, du glycérol, de la glucosamine, du N-acetylglucosamine et de l'acide N-acetylmuramique. La croissance de *L. monocytogenes* à partir de chitine et des parois des bactéries *Lactococcus lactis* a aussi été démontrée (Premarante *et al*.,1991). *Listeria* peut assimiler les composants cellulaires des bactéries et des levures lysées présentes dans son écosystème. Il a aussi été démontré que *L. monocytogenes* pouvait fermenter le lactose (Anderson *et al*., 2005).

La dépendance pour le fer de *Listeria* pour sa croissance et sa virulence a été étudiée par Coulanges *et al*. (1998). Cette bactérie, dépourvue de sidérophores, utilise des sidérophores exogènes ou des ligands présents dans le milieu environnant pour l'acquisition du fer.

2.2 Cas de compétition nutritionnelle décrits

Tomé *et al*. (2006) suggèrent un mécanisme de compétition nutritionnelle pour expliquer l'effet inhibiteur de bactéries lactiques isolées dans du saumon fumé contre *L. innocua*. L'inhibition de croissance de *L. monocytogenes* par *Carnobacterium piscicola* en milieu liquide est aussi liée à une compétition nutritionnelle (Buchanan et Bagi, 1997 ; Nilsson *et al*., 2005). Zhao *et al*. (2006)

ont révélé que l'application de bactéries compétitives par exclusion (*Lactococcus lactis* et *Enterococcus durans*) pouvait réduire les dénombrements de *Listeria* spp de 2,3 à 4,4 Log(UFC/100cm²) pour des taux initiaux compris entre 3,6 et 7,5 Log(UFC/100cm²) sur des sols d'industries de transformation de volailles (pour des températures de 3 à 26°C). Del Campo *et al*. (2001) suggèrent un mécanisme de compétition pour le glucose et/ou des acides aminés pour l'inhibition de *L. monocytogenes* par des *Enterobacteriaceae* isolées de feuille d'endive (*Enterobacter agglomerans* et *Rhanella aquantilis*) sur un milieu simulant la composition de l'exsudat de feuille d'endive. Pour Goerges *et al*. (2006), les 14 levures testées pour leur activité anti-*Listeria* ont toutes montré au moins une faible inhibition de *L. monocytogenes* (réduction d'1 à 5 Log(UFC/cm²) par rapport au témoin sans levure), ce qui pouvait être lié à un mécanisme commun de compétition nutritionnelle.

2.3 Modélisation de la compétition nutritionnelle

La compétition pour une source limitante commune entre *Listeria* et une flore compétitive a été modélisée par Cornu *et al*. (2001), Coleman *et al*. (2003), Gimenez et Dalgaard (2004), dans le cadre d'études concernant la croissance de *L. monocytogenes.* La population bactérienne minoritaire rentrerait en phase stationnaire plus tôt dès que la population majoritaire atteindrait elle-même la phase stationnaire (Jameson, 1962 ; Dalgaard et Jorgensen, 1998). Il y aurait alors saturation de la population totale à un niveau maximal et donc une compétition pour cette ressource limitante commune (Cornu *et al*., 2001). Cette entrée simultanée en phase stationnaire de deux populations bactériennes est appelée effet « Jameson » (Ross *et al*., 2000). Dans l'étude de Cornu *et al*. (2001), la modélisation est apparue suffisante pour décrire la majorité des interactions observées en milieu liquide et dans certains aliments (lait, saumon fumé et jambon cuit).

Cet effet « Jameson » a été décrit dans des suivis de croissance de *L. monocytogenes* dans des saumons fumés (Gnanou Besse *et al*., 2006). En effet, un ralentissement important de la croissance de *L. monocytogenes* a été observé pour différents niveaux de population de ce pathogène, quand les flores présentes atteignaient la phase stationnaire. Cependant, ce ralentissement de croissance peut être aussi lié à une acidification du produit due aux flores présentes. De plus, dans certains cas, la flore totale est restée à un niveau de dénombrement bas

pendant toute la durée de l'expérimentation. Un mécanisme complémentaire d'inhibition peut expliquer ce phénomène : un effet « géographique », lié à une croissance des colonies sur un milieu solide. La diffusion des cellules, nutriments et métabolites est en effet limitée par rapport au modèle planctonique (Gnanou Besse *et al*., 2006).

En revanche, l'environnement peut influencer ces phénomènes de compétition, notamment pour les atmosphères des emballages des légumes. Ainsi, Francis et Beirne (1998) ont démontré qu'avec 3% d'oxygène et 97% d'azote, la population de *L. monocytogenes* était de 3 Log(UFC) supérieure en co-culture avec la flore indigène (*Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Leuconostoc citreum*) qu'en culture pure après 8 à 12 jours à 8°C. Avec 100% d'azote, la population de *L. monocytogenes* en co-culture était de 5 Log(UFC) supérieure qu'en culture pure dans les mêmes conditions.

3. Molécules inhibitrices

3.1 Molécules d'origine bactérienne

3.1-1 Acides organiques

L'acide lactique, produit caractéristique de la fermentation du lactose par les bactéries lactiques exerce son activité antimicrobienne par une chute du pH de l'environnement mais aussi par sa forme indissociée qui peut diffuser au travers des membranes et réduire le pH intracellulaire (Holzapfel *et al*., 1995). L'acide acétique est le produit caractéristique de la fermentation de l'acide lactique par certaines bactéries (bactéries propioniques, leuconostocs, lactobacilles hétérofermentaires, lactocoques). Il peut aussi avoir une origine protéolytique. Il se caractérise par une constante de dissociation plus importante, ce qui le rend plus inhibiteur que l'acide lactique (Holzapfel *et al*., 1995). L'acide phenylacétique est un composé excrété par *Geotrichum candidum* et certaines bactéries lactiques (Lactobacilles : *L. plantarum*, *L. alimentarius*, *L. rhamnosus*, *L. sanfranciscensi*, *L. hilgardii*, *L. brevis*, *L. acidophilus* et Leuconostocs : *L. citreum*, *L. mesenteroides*) (Dieuleveux *et al*., 1998a ; Valerio *et al*., 2004). Sous l'action de l'acide phenylacétique (1 mg/ml), les cellules de *L. monocytogenes* s'agrègent et sécrètent des exopolysaccharides, puis elles s'affaissent et sont lysées (Dieuleveux *et al*., 1998b). En milieu

liquide, cet acide possède une activité bactéricide sur *L. monocytogenes* (7 mg/ml) mais seulement bactériostatique pour la même concentration dans du lait UHT et de la pâte de fromage. Les différentes matrices alimentaires peuvent être à l'origine de la diminution de l'effet inhibiteur (Dieuleveux et Guéguen, 1998).

Millet *et al*. (2005) ont fabriqué des fromages de type saint nectaire avec du lait cru préalablement inoculé avec *L. monocytogenes*. Une inhibition de *Listeria* a été mise en évidence dans les pâtes des fromages pour des pH inférieurs à 5,2 associés à des valeurs de lactates de 14 mg/g.

3.1-2 Bactériocines

Les bactériocines sont des protéines à activité antimicrobienne produites par des bactéries pour éliminer ou inhiber la croissance d'autres bactéries (Cleveland *et al*., 2001). De nombreuses bactéries lactiques produisent une grande diversité de bactériocines (lactocoques, lactobacilles, pediocoques, leuconostocs, entérocoques, *Carnobacterium*) mais aussi des staphylocoques (*S. epidermis* et *S. gallinarum*), des corynébactéries (*Brevibacteruim linens*), des actinomycètes (*Streptomyces* spp), des bacilles (*Bacillus subtilis*) et des coliformes (*Escherichia coli*) (Cleveland *et al*., 2001 ; Chen et Hoover, 2003). Les bactériocines sont classées en 3 grands groupes (Klaenhammer, 1993 ; Nes *et al*., 1996). Le groupe I est composé de peptides, de 19 à 50 acides aminés, avec des acides aminés spécifiques comme la lanthionine. Ce groupe est divisé en sous groupes Ia et Ib. Le sous groupe Ia, dont fait partie la nisine, est constitué de peptides, cationiques ou hydrophobes, qui forment des pores dans les membranes des cellules cibles. Le sous groupe Ib comporte des peptides globulaires. Le groupe II se compose de petits peptides stables à la chaleur qui se subdivisent en 3 sous groupes. Le sous groupe IIa est composée de peptides avec une séquence spécifique d'acides aminés N-terminaux. Le sous groupe IIb contient des bactériocines nécessitant 2 peptides différents pour l'activité antimicrobienne, et le sous groupe IIc contient le reste des bactériocines du groupe II. L'activité antimicrobienne des bactériocines du groupe II s'exerce par création de pores dans la membrane ou par interférence avec la structure de la membrane bactérienne. Le groupe III n'est pas encore bien caractérisé et se compose de grands peptides sensibles à la chaleur (Cleveland *et al*., 2001 ; Chen et Hoover, 2003).

L'utilisation de nisine (250 UI/ml) dans du lait écrémé contaminé avec *L. monocytogenes* Scott A entraîne une décroissance de ce pathogène jusqu'à moins de 10 UFC/ml après 9 jours à 5°C (Bhatti *et al*., 2004). Dans cette même étude, l'ajout de matière grasse laitière (2 et 3,5 %, m/m) induit une perte de l'effet anti-*Listeria*, attribuée aux interactions croisées de la nisine pour les phospholipides du milieu et ceux de la membrane des *L. monocytogenes*. Ennahar *et al*. (1998) ont révélé qu'une suspension bactérienne de *Lactobacillus plantarum* WHE 92, productrice de pédiocine AcH, déposée à la surface de fromages de type munster au début de l'affinage (10^5 UFC/ml) empêchait la croissance de *L. monocytogenes* déposées après 5 et 7 jours d'affinage (10^2 UFC/ml). En effet, en présence de *L. plantarum* WHE 92, *Listeria* n'a pas été retrouvée en fin d'affinage après 21 jours à 15°C, alors que les dénombrements pouvaient atteindre 10^4 à 10^5 UFC/g sur les témoins (absence de *L. plantarum*). Cette souche de *L. plantarum* présente aussi l'avantage de ne pas perturber le processus d'affinage. O'Sullivan *et al*. (2006) ont étudié l'influence de l'application d'une culture de *Lactococcus lactis* DPC4275 produisant de la lacticine 3147, sur la population de *Listeria monocytogenes* sur la surface d'un fromage, avant et après la contamination par ce pathogène. Ainsi, lorsque l'application a été réalisée avant la contamination, la population de *L. monocytogenes* n'a pas été affectée. Par contre, lorsque l'application a été réalisée après la contamination, une chute de la population de *L. monocytogenes* de 3 Log(UFC) a été notée suivie d'une phase de croissance avec une différence de 3 Log par rapport au témoin (absence de *L. lactis*) jusqu'à la fin de l'affinage. Si plusieurs applications de *L. lactis* étaient effectuées pendant l'affinage, la différence par rapport au témoin (absence de *L. lactis*) était de 2 Log. Ainsi, les cultures de *Lactococcus lactis* produisant de la lacticine sont bioprotectrices, mais elles n'entraînent pas une élimination complète de *L. monocytogenes*. Carnio *et al*. (2000) ont ensemencé une souche de *Staphylococcus equorum* WS 2733 produisant de la micrococcine P_1 sur un fromage à pâte molle suivi d'une contamination par *L. monocytogenes*. La population de ce pathogène a été réduite de 1 à 3 Log par rapport au témoin (staphylocoque non producteur de micrococcine) en fonction du taux de contamination de *Listeria* : plus ce taux était élevé, plus la réduction était faible. Eppert *et al*. (1997) ont observé une différence de population de 1 à 2 Log pour des *L. monocytogenes* et *L. ivanovii* contaminées sur des fromages affinés avec *Brevibacterium linens* M18 produisant et ne produisant pas de la linocine M18. L'activité de la linocine M18 a été détectée mais n'explique pas complètement l'inhibition observée. Giraffa et Carminati (1997) ont contaminé des surfaces de fromages de type Taleggio en fin d'affinage avec *L. monocytogenes* (10^2 et 10^3 UFC/cm²).

Deux séries de fromage sont été contaminées : en présence ou non d'une souche d'*Enteroccus faecium* 7C5 produisant une bactériocine. Après 14 jours, pour les 2 taux de contamination, la différence entre les 2 séries (présence et absence de *E. faecium*) était de 1 Log. Cette différence augmentait d'1 Log en cas d'ajout d'un filtrat de culture de la souche inhibitrice pour un taux de contamination de 10^3 UFC/cm². Loessner *et al*. (2003) ont étudié l'évolution de *L. monocytogenes* sur des fromages à croûte lavée avec ou sans *Lactobacillus plantarum* ALC 01 produisant une pédiocine AcH. Une inhibition presque complète de *Listeria* a été observée pour une contamination à 2 Log(UFC/ml) dans la solution de lavage sauf dans le cas de *Listeria* résistantes à la pédiocine, pour lesquelles une croissance a été observée. Les mutants résistants étaient stables à la surface des fromages jusqu'à 4 mois après la contamination. Les auteurs préconisent une utilisation ponctuelle des bactériocines en production fromagère.

En effet, tout comme pour les antibiotiques, des phénomènes de résistances envers les bactériocines ont été observés. Plusieurs mécanismes ont été mis en évidence chez *L. monocytogenes* : modification de la molécule membranaire cible de la nisine (Crandall et Montville, 1998), une rigidification de la membrane qui accroît la tolérance à la nisine (Mazzotta et al., 1997), et la synthèse d'une phosphotransférase (mode d'action envers la pédiocine PA-1 non élucidé) (Gravesen et al., 2000). Gravesen *et al*. (2004) ont étudié la fréquence du développement de résistance de *L. monocytogenes* à 2 bactériocines, la pédiocine PA-1 et la nisine A, en faisant varier les souches et les conditions environnementales. Les survenues des résistances à la pédiocine étaient d'environ 1 sur 10^6 pour toutes les conditions environnementales, alors que les fréquences de résistance à la nisine dépendaient de la souche et des conditions environnementales. Ces fréquences pouvaient varier de 10^{-7} à 10^{-2}. Cette étude a mis en évidence le développement des résistances aux bactériocines et l'influence de différents facteurs environnementaux comme les basses températures, les pH acides et la présence de NaCl sur la fréquence des résistances.

En plus des phénomènes de résistance des flores indésirables, les bactériocines peuvent aussi exercer leur activité inhibitrice contre les flores utiles, notamment les bactéries lactiques et perturber le processus technologique de fabrication de l'aliment. Ainsi, certaines espèces des genres *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* sont sensibles aux bactériocines du groupe I. De même, certaines espèces des genres

Enterococcus, *Lactobacillus* et *Pediococcus* sont sensibles aux bactériocines du groupe II (Chen et Hoover, 2003).

Ainsi, de nombreuses molécules synthétisées par des bactéries diverses ont prouvé leur efficacité anti-*Listeria* dans les fromages. Cependant, les phénomènes de résistance associés à une élimination non complète comme observé dans la majorité des cas cités ci dessus, ne sont pas en faveur du choix des bactériocines comme unique moyen de prévention de *Listeria*.

3.1-3 Autres molécules : peroxyde d'hydrogène et exo-polysaccharides

Le péroxyde d'hydrogène est produit par de nombreuses bactéries lactiques en présence d'oxygène et de lactate, pyruvate ou NADH (Holzapfel *et al*., 1995). Des cultures filtrées de souches de *Lactococcus lactis* produisant du peroxyde d'hydrogène ont permis de réduire une population initiale de 5,5 Log(UFC/ml) de *L. ivanovii* de 0,12 à 5 Log(UFC/ml) après 1h à 30°C (Ito *et al*., 2003).

Certains exo-polysaccharides non seulement limitent l'adhésion mais inhibent aussi la formation d'un biofilm mature d'un large spectre de bactéries. Ainsi, le polysaccharide synthétisé par les *E. coli* aux capsules du groupe II réduit à la fois l'adhésion et la formation de biofilm des bactéries pathogènes suivantes : *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* (Valle *et al*., 2006).

D'autres substances antimicrobiennes peuvent être synthétisées par certaines bactéries lactiques : de l'éthanol (fermentation hétérofermentaire), des métabolites de faibles poids moléculaires (reuterine, diacétyle, dioxyde de carbone) (Holzapfel *et al*., 1995). Pour ces derniers, l'application en bioprotection semble peu intéressante, sauf la reuterine pour la conservation du poisson ou de la viande.

3.2 Molécules d'origine laitière

3.2-1 Enzymes

Lactoperoxydase

La lactoperoxydase est une enzyme native du lait qui catalyse l'oxydation du thiocyanate par le peroxyde en produisant un anion hypothyocyanite, qui oxyde de nombreuses biomolécules. Cette oxydation des protéines et des enzymes à la surface de la cellule bactérienne entraîne une destruction de la membrane, une perte du gradient de pH, une fuite des ions potassium et une inhibition du transport des amino-acides et du glucose (García-Graells *et al*., 2000).

Gay et Amgar (2005) ont démontré l'effet inhibiteur du système lactopéroxydase sur *L. monocytogenes* dans du lait, probablement associé à la composition microbiologique du lait cru. Les croissances de ce pathogène (65h, 15°C) sont différentes en fonction du milieu : de 2 à 3,8 Log(UFC) dans du lait pasteurisé, de 0,8 à 2,3 Log(UFC) dans du lait cru et de 0 à 1,3 Log(UFC) pour du lait cru supplémenté en thiocyanate et peroxyde d'hydrogène. De même, l'incorporation de cette enzyme dans un film de protéines de lactosérum (29 mg par gramme de film sec) a réduit la population *L. monocytogenes* de 4,2 Log(UFC/cm²) à 4 et 10°C. Dans les mêmes conditions, l'adsorption de cette enzyme sur le film a permis une réduction de 1 à 3 Log(UFC/g) (Min *et al*., 2005a). L'association de l'utilisation de hautes pressions à 400 MPa, et 20°C, pendant 15 min et du système lactoperoxydase réduit une population de *L. innocua* de 7 Log UFC dans du lait écrémé (García-Graells *et al*., 2000).

Lactoferrine

La lactoferrine est une protéine du lait dont la principale propriété est de chélater le fer, propriété à la base de son activité antimicrobienne. En effet, le fer est une substance nécessaire à la croissance de nombreuses bactéries pathogènes dont *L. monocytogenes* (Brown et Holden, 2002). Cette enzyme peut se cliver en lactoferricine B, dont l'activité antimicrobienne est plus importante que la lactoferrine (Holzapfel *et al*., 1995). Ainsi, *in vitro*, la lactoferrine bovine à 2 g/l a montré une forte activité antimicrobienne contre *L. monocytogenes* (El-Sayed *et al*., 2003).

Lysozyme

Le lysozyme est une muraminidase qui hydrolyse la liaison β-1,4 entre l'acide N-acétylmuramique et le N-acétylglucosamine du petidoglycane, ce qui conduit à la lyse des bactéries à Gram positif. Cette enzyme peut être trouvée dans les oeufs et le lait (Holzapfel *et al*., 1995). L'incorporation de cette enzyme dans un film de protéines de lactosérum (204 mg par gramme de film sec) réduit la population de *L. monocytogenes* de 4,4 Log(UFC/cm²) ainsi que l'adsorption de cette enzyme sur le film (réduction de 2,4 à 4,5 Log(UFC/g)), à 4 et 10°C (Min *et al*., 2005b).

3.2-2 Acides gras

Sprong *et al* (2002) ont démontré *in vitro* l'activité antimicrobienne des acides gras C10:0, C12:0, des acides gras insaturés C18 du lait de vache (150 mg/l, pH 5) sur *L. monocytogenes*, avec des réductions observées de 7 Log(UFC/ml). Dans du lait écrémé, l'acide linoléique K-conjugué est listériostatique et prolonge considérablement le temps de multiplication à 4°C (Wang et Johnson, 1992).

Ces molécules d'origine laitière (enzymes et acides gras) ont donc démontré un effet anti-*Listeria* dans des milieux de culture, des films et du lait.

4. Quorum sensing

Kaprelyants et Kell (1996), sur la base d'observations personnelles et d'une revue bibliographique, ont suggéré que la croissance bactérienne est dépendante de phénomènes de communication cellulaire, communément appelés « quorum sensing ». Ce phénomène n'est pas très documenté chez *L. monocytogenes* (Gandi et Chikindas, 2007) mais quelques études ont suggéré l'existence de comportements dépendants de la densité cellulaire, tels que la croissance (Robinson *et al*., 2001) et la virulence (Ermolaeva *et al*., 2004). Smith *et al*. (2004) suggèrent d'approfondir les phénomènes de communication intercellulaire de *Listeria* pour contrôler la croissance de ce pathogène par identification de composés antagonistes du quorum sensing.

5. Utilisation de bactériophages

Les bactériophages peuvent être considérés comme des ennemis naturels des bactéries. Ils possèdent plusieurs caractéristiques : (*i*) ils éliminent leurs bactéries cibles vivantes, (*ii*) peu d'inactivations croisées ont été mises en évidence entre espèces et genres et, (*iii*) en raison de leur composition (protéines et acides nucléiques), les résidus de leur destruction ne sont que des acides aminés et des acides nucléiques (Carlton *et al*., 2005). Ils sont présents dans l'eau et des aliments divers, en particulier les aliments fermentés, jusqu'à 10^8 phages viables par gramme dans les produits carnés (Kennedy et Bitton, 1987 ; Sulakvelidze et Barrow, 2005).

Des applications de bactériophages P100 à la surface de fromages de type munster préalablement contaminés avec *L. monocytogenes*, ont conduit à une diminution de 3,5 Log(UFC) par rapport à l'absence de bactériophage, voire une éradication de ce pathogène pour une dose de 3.10^9 phages par ml (Carlton *et al*., 2005). L'application de bactériophages peut aussi être potentialisée par la combinaison avec une application de bactériocine, comme la nisine. Ainsi, en milieu à base de Tryptone Soja (TSB), l'association nisine/bactériophage LH7 réduit la population de *L. monocytogenes* par rapport aux actions de la nisine et des bactériophages seuls. Cette réduction est variable en fonction de la souche de *L. monocytogenes* et de la température (Dykes et Moorhead, 2002).

Les bactériophages apparaissent donc comme un moyen de prévention de *Listeria* supplémentaire. Leur applicabilité en milieu fromager reste néanmoins subordonnée à l'absence de lyse des bactéries lactiques nécessaires à la fabrication et l'affinage du fromage.

6. Mécanismes d'inhibition inconnus ou non démontrés

Dans de nombreuses études, une inhibition de *Listeria* par des consortia de surface de fromage ou la présence de est observée, mais le ou les mécanismes d'actions ne sont pas connus ou encore seulement suggérés mais non démontrés.

Maoz *et al*. (2003) ont contaminé avec *L. monocytogenes* des surfaces de fromages à pâte molle ensemencées avec des consortia microbiens issus de 3 fromageries, à 6 mois d'intervalle. Les

consortia de 2 fromageries ont montré un effet anti-*Listeria*, à la différence du consortium de la 3ème fromagerie qui a été considéré comme un témoin sans effet anti-*Listeria*. Pour le consortia de la première fromagerie, l'effet anti-*Listeria* était de 4 à 6 Log par rapport au témoin. Cet effet anti-*Listeria* était stable dans le temps et associé à la stabilité de la population du consortia. Le mécanisme n'a pas été élucidé mais l'absence de synthèse de substances inhibitrices par les bactéries a été mise en évidence. Pour le consortium de la 2ème fromagerie, l'effet anti-*Listeria* s'est avéré variable en fonction de la saison et de la quantité de consortium déposé, de 1 à 6 Log de réduction par rapport au témoin. Mayr *et al*. (2004) ont ensuite réimplanté 4 consortia microbiens de surface de fromage avec une activité anti-*Listeria* prouvée, issus des 2 fromageries étudiées par Maoz *et al*. (2003), sur des fromages à pâte molle affinés. Ces fromages ont ensuite été contaminés avec *L. monocytogenes* (10^1 et 10^2 UFC/ml de saumure) et le comportement de *Listeria* suivi à des températures différentes (13 à 16°C). Pour une fromagerie, la protection anti-*Listeria* des 2 consortia était stable par rapport à la température, avec une protection notée jusqu'à 40 jours. Pour l'autre fromagerie, l'activité anti-*Listeria* était variable en fonction de la durée et de la température d'affinage. Les auteurs soulignent que la spécificité de la composition des consortia et la température optimale de l'effet inhibiteur sont des caractéristiques propres à chaque environnement, pour l'effet anti-*Listeria*. Ils préconisent donc des traitements anti-*Listeria* adaptés à chaque environnement. Bockelmann *et al*. (2005) ont contaminé avec *L. monocytogenes* des surfaces de fromages de type Limburg, lavés avec différents mélanges de souches (*Microbacterium gubbensee*, *Arthrobacter nicotinae*, *Brevibacterium linens*, *Halomonas* spp, *Corynebacterium casei*). Durant les 2 semaines d'affinage, aucune inhibition n'a été observée, à la différence de la phase de stockage à 8°C dans les 2 semaines suivantes. Le mécanisme de cette inhibition est inconnu, mais les cultures pures de ces bactéries n'ont pas permis d'inhiber *Listeria* par test de diffusion en milieu gélosé. Les auteurs suggèrent le rôle de la faible température, de la forte salinité et du faible taux d'oxygène. Carminati *et al*. (1999) ont contaminé avec *L. monocytogenes* des fromages taleggio (pâte molle) à différents stades d'affinage, préalablement ensemencés avec 2 mélanges bactériens candidats à l'inhibition de *Listeria*. Un effet listériostatique a été observé dans les 2 cas, lié à la présence d'un riche complexe microbien et à un pH bas, suite à un problème d'affinage. Sur la surface de ces mêmes fromages (taleggio), Carminati *et al*. (2000) ont déposé 3 Log(UFC) par fromage de *L. innocua* après 2 ou 4 semaines d'affinage. Lors de la contamination à 2 semaines d'affinage, 5 semaines plus tard, *Listeria* avait colonisé toute la surface du fromage (5,1 Log(UFC) par

fromage) et des contaminations croisées avec d'autres fromages affinés ensemble ont été observées (3,5 Log(UFC) par fromage), à priori par la solution de lavage des fromages. Lors de la contamination à 4 semaines d'affinage, 3 semaines plus tard, *Listeria* n'avait pas colonisé la totalité de la surface (3,7 Log(UFC) par fromage) et moins de contaminations croisées ont été observées (souvent au seuil de détection de 0,89 Log(UFC/cm²)). *Listeria* a aussi été trouvée dans les eaux de lavages des fromages 5 jours après la contamination, mais pas par la suite. Ainsi, les contaminations croisées sont moins présentes lorsque *Listeria* est contaminée sur des fromages à 4 semaines d'affinage, avec une population totale de surface supérieure de 2 Log(UFC) aux fromages à 2 semaines d'affinage. Les suggestions des auteurs pour le mécanisme sont la compétition nutritionnelle ou la synthèse de molécules inhibitrices, bactériocines ou acides organiques.

Certains micro-organismes isolés à la surface de fromages ont aussi démontré une activité anti-*Listeria*. Carnio *et al*. (1997) ont analysé différents consortia présents à la surface de fromages français et allemands. Pour les fromages français, sur 2613 isolats, 48 ont montré une inhibition de *Listeria* sur milieu solide. Pour 3 de ces isolats, la présence de substances inhibitrices solubles a été démontrée. Pour les fromages allemands, sur 300 isolats, 30 ont montré une inhibition de *Listeria* sur milieu solide, sans mécanisme associé. Lors du programme européen SCM (Etude Smear Cheese Microflora Projet QLK1-CT-2001-02238 « Biodiversity and anti-Listerial activity of surface microbial consortia from Limburger, Reblochon, Livarot, Tilsit ans Gubbeen cheese, 2002-2004), l'étude sur la flore fongique de surface du reblochon de Savoie a été effectuée. Pour les 439 levures isolées sur 3 sites de production, l'activité anti-*Listeria* a été évaluée sur 5 souches de *L. monocytogenes* en milieu solide. Seize levures ont montré une forte inhibition de *L. monocytogenes*. Parmi celles-ci, 3 ont été sélectionnées pour tester leur activité anti-*Listeria* à la surface de reblochons. Les levures ont été déposées à la surface des fromages (10^6 UFC/cm²) 3 jours avant l'inoculation des *L. monocytogenes* (1 et 10 UFC/cm²). A la différence des essais en milieux de culture, l'inhibition de *L. monocytogenes* par les levures sélectionnées n'a pas été observée à la surface de fromages.

En conclusion, de nombreux mécanismes d'inhibition ont été démontrés envers *L. monocytogenes*. Certains ont déjà été validés dans les aliments, pour d'autres ce travail reste

encore à effectuer. Pour la majorité d'entre eux, *Listeria* n'est pas éliminée, mais sa croissance ralentie ou inhibée.

Par contre, très peu d'études ont montré une interaction favorisante de bactéries envers *L. monocytogenes*. Leriche (1999), Mettler et Carpentier (1998) ont montré que des biofilms de certaines souches de *Pseudomonas* favorisaient la formation de micro-colonies de *L. monocytogenes.* Buchanan et Bagi (1999) ont montré qu'en fonction des conditions environnementales (température, NaCl, pH), une souche de *Pseudomonas fluorescens* pouvait ne pas affecter, favoriser ou inhiber la croissance de *L. monocytogenes* en milieu liquide. En ce qui concerne l'adhésion de *Listeria*, Hassan *et al*. (2004) ont démontré une adhésion de *L. monocytogenes* plus importante (3 Log(UFC/cm²)) sur un biofilm préexistant de *Pseudomonas putida* que sur de l'acier inoxydable. Bremer *et al*. (2001) ont révélé qu'un plus grand nombre de cellules de *L. monocytogenes* adhéraient sur de l'acier inoxydable en co-culture avec *Flavobacterium* spp qu'en culture pure.

Ainsi, *Listeria monocytogenes* semble avoir des difficultés à s'implanter et à se développer en surface en communauté avec d'autres bactéries. Carpentier et Chassaing (2004) ont démontré que seules 4 souches (*Kocuria varians*, *Staphylococcus capitis*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Comamonas testosteroni*) parmi 29, isolées dans l'environnement agro-alimentaire, ont permis la croissance de *Listeria* en co-culture binaire sur des coupons d'acier inoxydable.

Les moyens de prévention du développement de *Listeria* recensés dans la littérature sont pour les molécules d'origine laitière, une diminution de l'adhésion et une inhibition de croissance. Pour les micro-organismes, l'effet anti-*Listeria* peut être lié à plusieurs mécanismes : une diminution de l'adhésion, une synthèse de molécules inhibitrices et une compétition nutritionnelle. Ces différents mécanismes associés à la difficulté de *Listeria* à se développer en communauté avec d'autres micro-organismes font du biofilm barrière ou positif, un moyen particulièrement prometteur pour maîtriser *Listeria* dans les aliments ou les ateliers agro-alimentaires

Pour une application alimentaire, en plus d'une totale innocuité, d'autres facteurs sont à prendre en compte comme la possibilité d'inclure le traitement de prévention de *Listeria* dans la fabrication de l'aliment, l'absence de modifications des qualités organoleptiques du produit fini et l'acceptation par le consommateur du traitement de prévention de *L. monocytogenes*

(Devlieghere *et al*., 2004). Tous ces traitements de prévention restent néanmoins à associer à la première barrière contre *Listeria* : les bonnes pratiques de fabrication, de stockage et de distribution des aliments (Holzapfel *et al*., 1995).

Chapitre 3 Le support bois en agro-alimentaire

Ce chapitre est une synthèse autour d'un matériau particulier, le bois et son utilisation en agro-alimentaire. Sa structure et les propriétés qui en découlent sont détaillées ainsi que ses applications en agro-alimentaire. Les relations bois-bactéries sont ensuite abordées par les études des substances antimicrobiennes présentes dans le bois, de la survie des micro-organismes sur ce matériau et sa nettoyabilité. Enfin, les interactions bois-bactéries en technologie alimentaire, décrites dans la littérature sont abordées.

I. Structure et principales propriétés du matériau bois

1. Physiologie et structure anatomique

Le bois est un matériau particulier en raison de son origine et de son organisation. Il est en effet formé d'une matière hétérogène élaborée par un organisme vivant. Cette élaboration se fait suivant des lois déterminées par l'espèce de l'arbre, influencées par des circonstances diverses (sol, altitude, climat, mode d'exploitation de la forêt).

Le tronc de l'arbre est formé d'un ensemble de cellules accolées les unes aux autres. Elles forment des tissus qui remplissent deux fonctions essentielles : le soutien de l'ensemble des parties aériennes de l'arbre et la conduction des liquides (eau et sels minéraux) puisés dans les racines et nécessaires à la fonction vitale du feuillage. Cette ascension se fait dans les zones les plus jeunes du bois (aubier). La structure anatomique des bois est différente selon le groupe auquel les arbres appartiennent, celui des gymnospermes (conifères), ou celui plus évolué, des angiospermes (Bailly *et al*., 1984). Dans ce groupe, les arbres feuillus appartiennent à la classe des dicotylédones. Le tissu fibreux, ossature principale du bois et tissu de soutien chez les bois feuillus, joue en même temps chez les résineux le rôle du tissu de conduction. Les fibres portent à cet effet des ponctuations spéciales, qui établissent des communications d'une cellule à une cellule voisine, par où s'effectuent des échanges (ponctuations aréolées). Ces fibres de nature

particulière sont appelées chez les résineux les trachéides. Constituant à elles seules la quasi totalité du bois des résineux, elles lui donnent cet aspect homogène caractéristique. Chez les feuillus, dont le bois est beaucoup plus différencié que les résineux, le rôle de conduction est dévolu au tissu vasculaire.

Lorsque l'arbre atteint un certain âge, les couches de cellules les plus anciennes, donc les plus internes, cessent d'assurer leur fonction de conduction et subissent une évolution plus ou moins marquée, la duraminisation (Campredon, 1952). Cette étape correspond à une perte en eau libre et un durcissement des parois par lignification pour former le bois parfait, la zone la plus ancienne du tronc. Il est important de distinguer le bois de l'aubier, du point de vue de leur emploi. Ce dernier est en général plus tendre, moins dense et moins résistant. Ces 2 parties sont dans certains cas différentiables à l'œil nu comme sur la Figure III.1. Chez certaines essences (sapin, épicéa, peuplier), l'aubier n'est pas différent du bois parfait, ces 2 parties peuvent donc être employées pour les mêmes usages.

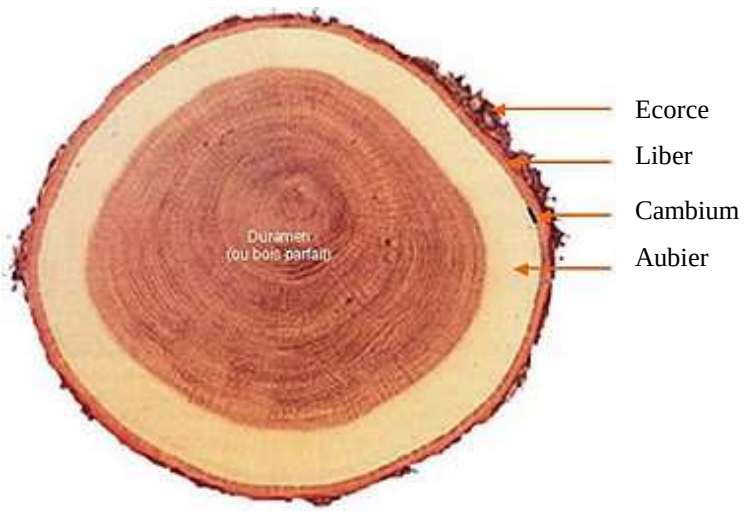


Figure III.1. Coupe transversale d'un tronc d'un arbre dont l'aubier est distinct du bois parfait (CTBA, 1998).

2. Composition chimique

Le Tableau III.1. résume les principaux constituants du bois, dont la cellulose, polymère du glucose sous forme cristalline et amorphe dans le bois est le principal constituant de la paroi de toutes les cellules végétales. Les hémi-celluloses sont des polyhétérosides se présentant sous la forme d'une structure comparable à un gel déshydraté, associés à la cellulose dans la paroi. La lignine est un polymère de structure amorphe imprégnant les parois des cellules végétales duraminisées. La composition de la matière minérale varie d'une essence à l'autre et en fonction de la nature du sol. Cette matière minérale peut être située dans les parois ou dans les cavités des cellules du bois. Parmi la matière organique citée dans le Tableau III.1, se trouvent des résines et oléorésines (huiles essentielles), des tanins, des colorants, voire même des alcaloïdes et des toxiques, principalement dans les essences tropicales. La présence et les teneurs de ces différents composés varient en fonction de l'essence.

Tableau III.1. Répartition des différents constituants du bois (CTBA, 1998)

Constituants du bois	% (m/m)
Cellulose	40 à 50%
Hémi-cellulose	10 à 30%
Lignine	15 à 30%
Matières organiques et minérales	0,5 à 2%

3. Propriétés du bois

Les propriétés techniques du bois sont les conséquences de sa structure et de sa composition chimique. Ces deux caractéristiques dépendent d'une part de l'essence et d'autre part, des conditions de croissance de l'arbre. On distingue parmi les propriétés techniques du bois les propriétés physiques, mécaniques et chimiques (CTBA, 1998).

3.1 Propriétés physiques

Parmi d'autres propriétés comme les faibles conductivités thermique et électrique, la capacité d'hydratation du bois est une caractéristique importante. En effet, le bois contient toujours une quantité d'eau plus ou moins importante suivant les conditions dans lesquelles il est placé. Ainsi, un équilibre s'établit entre le degré d'humidité du bois et l'humidité relative de la pièce où il est stocké. Cette variation d'humidité entraîne une variation de densité ainsi qu'une rétractabilité (variation du volume en fonction du taux d'humidité).

3.2 Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques du bois lui permettent de résister aux efforts qui lui sont imposés dans l'industrie et la construction : résistance à la compression, à la traction, à la flexion, au choc, aptitude au fendage et dureté.

3.3 Propriétés chimiques

En plus de sa combustibilité, le bois est le plus souvent doté d'un caractère acide, principalement dû à la présence d'acides organiques (acétique, formique et oxalique). Choon et Raffael (1990) ont comparé les pH de cinq bois différents en fonction de la température. A part le chêne qui présente un caractère acide prononcé (4,3 à 20°C), les quatre autres essences (acacia, hévéa, jelutong et punah, deux arbres malaisiens) présentent un pH plus neutre (de 5,8 à 6,3 à 20°C). Pour les cinq essences, le pH s'abaisse avec l'augmentation de température (de 2,9 à 3,4 à 103°C).

Une autre propriété chimique particulièrement intéressante du bois est sa résistance aux champignons et aux insectes. Cette durabilité est la conséquence de la composition chimique du bois : pH acides pour le chêne (Choon et Raffael, 1990), présence de tanins ou de résine dans le bois parfait (Guinier, 1974), présence de composés antifongiques (tetra et penta hydroxy-stilbènes) (Wang *et al*., 1983). Cette dernière étude a aussi démontré le lien entre la résistance à

la pourriture du bois et sa teneur en extraits solubles dans le méthanol. La résistance du bois aux champignons est cependant fortement liée au taux d'humidité dans lequel il est placé.

Ainsi, l'organisation anatomique de l'arbre, ainsi que son système de circulation et ses moyens de défense, sont à l'origine de la structure spécifique du bois et de ses propriétés physico-chimiques particulières. Parmi celles-ci, les propriétés du bois exploitées en agro-alimentaire sont détaillées dans la prochaine partie.

II. L'utilisation du bois en agro-alimentaire

1. Historique

Le bois est un matériau utilisé dans la fabrication des aliments et leur stockage. En effet, le bois est une ressource naturelle renouvelable dont la technique de travail et de transformation est simple. Ce matériau était donc présent sous de nombreuses formes dans les secteurs agricoles et alimentaires. Tables, seaux, bacs, instruments (cuillères, spatules, louches…) étaient des objets communs à différents secteurs. Certains objets étaient plus spécifiques : gerles, barattes, moules à beurre ou à fromage, sangles, planches d'affinage pour la production laitière, presses tonneaux, fûts, pour la production des boisons alcoolisées et billots et manches des couteaux pour l'industrie de la viande et de la charcuterie. Selon les régions, certaines essences de bois étaient plus répandues que d'autres, et cette répartition se retrouve dans le choix des essences en fonction des productions. Ainsi, l'épicéa était utilisé pour les planches d'affinage des fromages en montagne et le chêne était utilisé pour fabriquer les fûts nécessaires à la production viticole en plaine.

Au fur et à mesure de l'industrialisation des procédés de fabrication, le bois a été progressivement remplacé par des matériaux qui semblaient plus appropriés : fer ou cuivre étamé, almasilium puis acier inoxydable et enfin certains polymères comme le polypropylène ou le polyéthylène. Ces changements ont eu pour effet de révéler les propriétés particulières du bois et d'associer le bois à des notions de tradition et de typicité (Richard, 1997). Aujourd'hui, le bois est utilisé comme emballage au contact direct dans les filières fruits et légumes (cageots, cagettes), produits de la mer (caisse, caissettes, bourriches), produits transformés à base de lait

(boites, faux-fonds, sangles), boulangerie-pâtisserie (panière, corbeille), confiserie (bonbonnières). Il est aussi utilisé comme support de fabrication et équipement. Les différentes applications concernées sont les planches, les cercles et les gerles pour la fabrication de fromages, les tonneaux pour la fabrication de vins et alcools, les piques à brochette pour viandes, poissons, légumes et fruits, les bâtonnets pour glace alimentaire, les billots de découpe pour la viande, les plans de travail et les ustensiles de cuisines pour tous types d'aliments (note de la DGCCRF n° 2006-58 du 1er mars 2006).

2. Propriétés du bois exploitées en agro-alimentaire

Trois propriétés particulières du bois exploitées par l'agro-alimentaire sont la transmission de molécules entre le bois et les produits à son contact, l'ensemencement en flores technologiques pour les produits fermentés, et surtout l'échange d'humidité avec son environnement direct. Elles sont détaillées au travers de l'exemple des 2 principaux secteurs de production de l'agro-alimentaire utilisant le bois dans leurs équipements : les vins et boissons alcoolisées et les produits laitiers.

2.1 Le bois et la production de vins et boissons alcoolisées : transfert de molécules et interactions bois-bactéries

Dans le domaine de la production de boissons alcoolisées, de nombreuses boissons sont vieillies dans des fûts de bois principalement du chêne ou du mélèze. Nombreuses sont les études qui ont démontré le rôle important joué par le bois dans la maturation des boissons alcoolisées, notamment le vin et le whisky. Ces études, reprises par Mosedale et Puech (1998), ont montré que les modifications des breuvages pendant le vieillissement pouvaient être liées à 4 mécanismes : à un transfert direct des composés du bois, à une décomposition des macromolécules du bois puis le transfert des produits de ces décompositions au liquide, à des réactions entre les composants du bois et les constituants du breuvage et à des réactions concernant uniquement les extraits du bois. Des études ont aussi porté sur l'influence des différentes espèces de chênes composants les fûts, du temps de vieillissement en fûts et le remplacement des fûts en bois par la présence de chips en bois sur les composés volatils du vin,

bases des arômes (Garde-Cerdán et Ancín-Azpilicueta, 2006). Plus récemment, une étude a démontré une interaction bactérie–bois avec une influence sur le produit fini : *Oenococcus oeni* a la capacité de transformer des composés du bois en composés volatils influençant les arômes du vin (De Revel *et al*., 2005).

2.2 Utilisation du bois pour la production des produits laitiers : régulation de l'humidité, ensemencement en flores technologiques, transmission de molécules

Dans le domaine des produits laitiers, peu de publications ont été réalisées sur le sujet, même si de nombreuses productions utilisent le bois dans leur processus de fabrication. La quantité de fromages affinés sur bois est estimée à plus de 350 000 tonnes de fromage par an en France (communication personnelle, J.-F. Chamba et E. Notz, ITFF). Le Tableau III.2 liste les matériaux traditionnels utilisés en fromagerie (communication personnelle, CNAOL, Syndicat AOC). Pour certains fromages avec une Appellation d'Origine Contrôlée, l'utilisation du bois est citée dans les décrets relatifs aux appellations.

Le Tableau III.2 souligne la diversité d'utilisation du bois en fromagerie et les nombreuses productions où le bois est utilisé. La principale propriété du bois utilisée en fromagerie est son hygroscopie. En effet, par empirisme et en comparaison avec d'autres matériaux, l'hygroscopie ou la capacité du bois à échanger l'eau et l'humidité avec son environnement direct, est associée à une meilleure formation de la croûte des fromages (Faure, 1997). Le bois est utilisé sous forme de planches pour l'affinage de nombreux fromages, de chêneaux pour l'égouttage des fourmes, de stores d'égouttage pour les bries de Meaux et de Melun, le camembert de Normandie et le pont l'Evêque, et de faux-fonds, disques d'épicéa étuvés à 95°C, placés sur le chevrotin et le reblochon. Pour ces derniers, l'utilisation du bois entre dans les critères AOC. Ainsi, le reblochon de Savoie doit être emballé individuellement dès la sortie d'affinage en présence d'un faux fond (décret du 15 novembre 1999, paru au JO n°268 du 19 novembre 1999), de même que le chevrotin, qui doit en plus être séché et affiné sur des planches d'épicéa (décret du 2 mai 2002, paru au JO n°104 du 4 mai 2002).

Tableau III.2. Liste des matériaux traditionnels utilisés en France pour la préparation, le conditionnement ou l'emballage des produits laitiers (communication personnelle, CNAOL, Syndicat AOC).

Produits	Locaux	Matériaux traditionnels spécifiques	
		Préparation et affinage	Conditionnement et emballage
ABONDANCE	Cave naturelle	Cuve en cuivre, Planche et moule en **bois**, Toiles végétales	
BANON		Toiles végétales **Bois**	Feuille de châtaigner Raphia Caissettes en bois
BEAUFORT	Cave naturelle	Cuve en cuivre, Planche, cercle, foncets en **bois**, Toiles végétales	
BEURRE DE CHARENTES POITOU		Baratte en **bois**	
BLEU D'AUVERGNE	Cave naturelle (briques) Tunnel	Planche en **bois**	
BLEU DE GEX HAUT JURA		Planche en **bois** Toiles végétales	
BLEU DES CAUSSES	Cave naturelle	Planche en **bois**	Feuille d'étain
BLEU DU VERCORS SASSENAGE		Cuve en cuivre Planche en **bois**	
BRIE DE MEAUX		**Bois** pour store, planche de hâloir Planche en **bois** Jonc d'égouttage	
BRIE DE MELUN		**Bois** pour store et planche de hâloir Paillon de resserrage Planche en **bois**	
BROCCIU	Cave naturelle	Cuve en cuivre, Planche et ustensiles en **bois**	
CAMEMBERT DE NORMANDIE		**Bois** pour stores et planche de hâloir	Boîte en **bois**
CANTAL	Cave naturelle Tunnel	Gerle, Planche et ustensiles en **bois** Toiles végétales	
CHABICHOU DU POITOU		Paillons	Caisses en **bois**
CHAOURCE			Boites et caissettes en **bois**
CHEVROTIN	Cave naturelle	Cuve en cuivre, Planche et ustensiles en **bois**, Toiles végétales	Boîte en **bois** (faux-fond)
COMTE	Cave naturelle	Cuve en cuivre, Planche en **bois**, Toiles végétales, Echelle, foncets, cercles, petit matériel en **bois**	
CROTIN DE CHAVIGNOL		Toiles végétales Paillons	Caisse en **bois**
EMMENTAL DE SAVOIE IGP	Cave naturelle	Cuve en cuivre Planche et ustensiles en **bois** Toiles végétales	
EPOISSES	Cave naturelle		Boîte en **bois**
FOURME D'AMBERT	Cave naturelle Tunnel	Planche et chenaux d'égouttage en **bois**	

Produits	Locaux	Matériaux traditionnels spécifiques	
		Préparation et affinage	Conditionnement et emballage
FOURME DE MONTBRISON	Cave naturelle Tunnel	Planche en **bois** Chenaux en **bois**	
LAGUIOLE	Cave naturelle Tunnel	Planche en **bois** Toiles végétales	
LANGRES		Planche en **bois**	Fond de boîte en **bois**
LIVAROT	Cave naturelle	Planche et store en **bois**	Lichée
MACONNAIS	Cave naturelle	Planche en **bois**	Caisse en **bois**
MAROILLES	Cave et hâloir naturelle Mur en briques	Planche en **bois**	
MONT D'OR	Cave naturelle	Cuve en cuivre, Planche en **bois**, Toiles végétales	Cerclage en **bois** Boîtes en **bois**
MORBIER	Cave naturelle	Cuve en cuivre, Planche en **bois**, Toiles végétales, Outils, cercles en **bois**	
MUNSTER GEROME	Cave naturelle	Cuve en cuivre, Planche et moule en **bois**, Cuillères en cuivre ou en laiton	Boîte en **bois**
NEUFCHATEL	Cave naturelle	Planche en **bois**	
OSSAU-IRATY	Cave naturelle Tunnel	Cuve en cuivre, Planche et ustensiles en **bois**, Orties, Toiles végétales, Moule en métal	
PICODON	Cave naturelle (briques)	Planches en **bois** Cuves (biches) en grès	Caissette en **bois**
PONT L'EVEQUE	Cave naturelle	Planche et store en bois	Lichée
POULIGNY ST PIERRE	Cave naturelle		Caissette en **bois** Paille
REBLOCHON	Cave naturelle	Cuve en cuivre, Planche et ustensiles en **bois**, Toiles végétales	Faux-fond en **bois**
ROCAMADOUR		Toiles végétales	Caisse en **bois**
ROQUEFORT	Cave naturelle	Planche en **bois**	Feuille d'étain
SALERS	Cave naturelle Tunnel	Gerle, planche et ustensiles en **bois**, Toiles végétales	
ST NECTAIRE	Cave naturelle	Gerle, planche en **bois**, Toiles végétales Paillons de seigle	
STE MAURE DE TOURAINE	Cave naturelle	Planche en **bois**	Paille de céréale Caissette en **bois**
TOME DES BAUGES	Cave naturelle	Cuve en cuivre, Planche et ustensiles en **bois**, Toiles végétales	
TOMME DE SAVOIE IGP	Cave naturelle	Cuve en cuivre, Planche et ustensiles en **bois**, Toiles végétales	
VALENCAY		Planche, table de salage en **bois,**	Caissettes en **bois**
RACLETTE DE SAVOIE projet IGP	Cave naturelle	Cuve en cuivre Planche en **bois**	

L'ensemencement en flore d'intérêt technologique par un support bois d'une fabrication à l'autre est aussi une propriété exploitée, sur les planches d'affinage (Faure, 1997) mais aussi en filière salers. Pendant la traite, le lait doit être immédiatement réceptionné dans un récipient en bois, tronconique ou cylindrique dénommé la « gerle ». Dans ce récipient, il est ensuite emprésuré, puis le caillé est découpé (décret du 14 mars 2000, paru au JO n°65 du 17 mars 2000).

Dans le cas du vacherin mont d'or, l'utilisation traditionnelle du bois dans le processus d'affinage permet le transfert des molécules du bois vers le produit, en générant des goûts spécifiques (Bosset *et al*., 1997). Parmi ces molécules, se trouvent le p-cymène, le limonène, le γ-terpinène, l'α-bornéol et l'α–terpinéol qui sont des composés des résineux. Dans le décret du 17 mai 2006, paru au JO n° 116 du 19 mai 2006, il est stipulé que ce fromage est cerclé d'une sangle d'épicéa et inséré dans une boite de ce même bois. Le sanglage intervient après le démoulage et l'affinage sur planche d'épicéa. Le sanglage et la boîte assure aussi un maintien et une protection du fromage. Pour la fabrication du Beaufort, le caillé est rassemblé dans une toile et moulé dans le cercle de bois, dit « cercle à beaufort » (décret du 19 janvier 2001, paru au JO n°22 du 26 janvier 2001). Ce cercle particulier présente sur sa face interne une convexité qui donne la forme concave du talon, caractéristique du beaufort.

Le bois est également utilisé sous forme de cendres, qui interviennent dans la formation de la croûte des fromages Sainte-Maure de Touraine (décret de 29 juin 1990, paru dans le JO n°152 du 3 juillet 1990) et des fromages Selles-sur-Cher (décret du 8 août 1994, paru au JO n°187 du 13 août 1994).

Une étude a été réalisée sur les planches d'affinage en bois a recensé les différentes pratiques fromagères de nettoyage des planches en bois. Ce programme, « Evaluation et maîtrise du risque microbiologique dans l'utilisation du bois pour l'affinage des fromages », a été réalisé par l'Institut Technique Français des Fromages (ITFF), dans le cadre d'un programme de l'Association de Coordination Technique pour l'Industrie Agro-alimentaire (ACTIA) (programme n° RA 97.31) et a pris fin en 2000. Cette étude a démontré que le brossage à l'eau froide ou tiède (< 35°C) et le passage en cabine de lavage (eau pulsée à hautes pressions et hautes températures, 82°C) sont les deux procédés les plus couramment employés par les

professionnels fromagers. Ils conduisent à une réduction de la FMAR (Flore Mésophile Aérobie Revivifiable) de 2 à 3 Log et 4 à 5 Log pour, respectivement, le brossage et la cabine de lavage. Toutes ces propriétés du bois exploitées en agro-alimentaire soulignent l'importance de l'utilisation du bois dans le processus de fabrication des boissons alcoolisées et des fromages.

3. Législation autour du bois

3.1 Textes concernant les matériaux au contact des denrées alimentaires

Le règlement n°1935-2004 du Parlement Européen et du Conseil Européen du 27 octobre 2004, concerne les matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires. Ce règlement reprend le principe d'inertie : il stipule que les matériaux ne doivent pas céder aux denrées alimentaires des constituants en une quantité susceptible de présenter un danger pour la santé humaine, ou d'entraîner une modification inacceptable de la composition des denrées, ou d'entraîner une altération des caractères organoleptiques de celles-ci. Dans ce règlement, le bois fait partie de la liste des matériaux pour lesquels des mesures spécifiques peuvent être adoptées comme par exemple, des conditions particulières d'emploi, des décisions de limites de migration acceptables de certains constituants, ou l'élaboration d'une liste de substances autorisées pour la fabrication des objets.

3.2 Textes concernant le choix des essences :

L'arrêté du 15 novembre 1945 concerne « la liste des matériaux susceptibles d'être utilisés pour la santé publique, dans la fabrication des instruments de mesures en contact direct avec les denrées alimentaires ». Parmi d'autres matériaux, sont autorisés pour toutes les denrées alimentaires, les bois de chêne, de châtaignier, de frêne, de charme ou de robinier et pour les solides alimentaires les bois de hêtre, de noyer, d'orme et de peuplier. Cet arrêté a ensuite été modifié par la lettre circulaire du 28 novembre 1980, relative aux matériaux au contact des denrées alimentaires, qui étend les dispositions de l'arrêté du 15 novembre aux récipients destinés au stockage et à la conservation des boissons et denrées alimentaires.

D’autres essences traditionnellement utilisées en France ont ensuite été reconnues aptes au contact alimentaire : sapin, épicéa, douglas, pin maritime, pin sylvestre, platane, tremble, aulne, olivier, bouleau (avis de l’administration parus au BID-Bulletin d’information et de documentation- n°81-046, 82-331, 83-341, 87-168, 88-497, 90-387, 92-338, 97-132,97-306). Pour les produits laitiers, la décision de la commission n° 96/536 du 29 juillet 1996, modifiée par la décision 97/284 du 25 avril 1997, établissant la liste des produits à base de lait pour lesquels les Etats membres sont autorisés à accorder des dérogations individuelles ou générales est à l’origine de l’ajout de certaines de ces essences. En effet, cette décision stipule que pour les produits à base de lait présentant des caractéristiques traditionnelles, des dérogations peuvent être accordées en ce qui concerne la nature des matériaux composant les équipements spécifiques à la préparation, au conditionnement ou à l’emballage de ces produits. Ces équipements devront toutefois être maintenus de façon constante dans un état de propreté satisfaisant, régulièrement nettoyés et désinfectés.

3.3 Textes concernant les produits de traitements du bois

La Directive n°76/769/CEE du Conseil du 27 juillet 1976 concerne la limitation de la mise sur le marché et de l’emploi de certaines substances et préparations dangereuses. A l’exception des traitements antifongiques pour les conteneurs de fruits et légumes, les articles en bois destinés au contact alimentaire ne doivent pas avoir fait l’objet d’un traitement chimique de préservation.

3.4 Le « paquet hygiène »

La réglementation européenne relative à l’hygiène des aliments et à l’alimentation animale ou « paquet hygiène » est entrée en vigueur le 1er janvier 2006. Parmi les nouveaux règlements mis en place, les matériaux lisses et étanches, comme le plastique et l’acier inoxydable, sont préconisés, préférés au bois en raison de son caractère poreux. Le règlement n°852/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004, paru le 30 avril 2004, concerne l’hygiène des denrées alimentaires. Il stipule que les équipements ou articles entrant en contact avec les denrées alimentaires, doivent être construits, réalisés et entretenus de manière à réduire au maximum les risques de contamination et à ce qu’ils soient tenus propres et, au besoin désinfectés. Le règlement n°2074/2005 de la Commission du 5 décembre 2005, paru le 22

décembre 2005, accorde une dérogation pour les denrées alimentaires présentant des caractéristiques traditionnelles (même définition que pour la décision de la commission n°96/536 du 29 juillet 1996) concernant la nature des matériaux composants les équipements utilisés pour la préparation, l'emballage et le conditionnement de ces produits. Ces équipements doivent être maintenus en permanence dans un état hygiénique satisfaisant et régulièrement nettoyés et désinfectés.

III. Ecologie microbienne du bois

L'écologie microbienne peut être définie comme l'étude des interactions existant entre les populations de micro-organismes, regroupées en une communauté complexe et leur environnement ; l'ensemble micro-organismes - environnement constitue un écosystème.

Plusieurs aspects de cette question ont été étudiés dans la littérature scientifique : tout d'abord la présence de substances inhibitrices dans le bois, puis l'interaction directe bois-bactéries par l'étude de la survie des micro-organismes et de la nettoyabilité du bois et enfin la colonisation du bois par des écosystèmes microbiens d'intérêt technologique.

1. Substances antimicrobiennes du bois

Parmi les composants du bois décrits au Tableau III.1, seuls les 0,5 à 2% des matières minérales et organiques peuvent contenir des composés inhibiteurs. En effet, parmi ces dernières se trouvent les huiles essentielles, qui sont connues pour leurs propriétés aromatiques et médicinales mais aussi pour leurs propriétés antimicrobiennes. Les huiles essentielles sont des composés aromatiques liquides obtenus à partir des végétaux, du bois mais aussi des fleurs, des graines, des feuilles, des fruits, des racines (Burt, 2004). Elles peuvent contenir jusqu'à 60 composés différents. Parmi ceux-ci, les composés phénoliques (par exemple le carvacrol, le thymol, le terpinène, les pinènes et l'eugénol) sont principalement responsables des propriétés antibactériennes des huiles essentielles (Cosentino *et al.*, 1999). Peu d'études ont été réalisées sur les mécanismes d'action des huiles essentielles, qui dépendent des composés intrinsèques de chaque huile (Lambert *et al*., 2001). Les cibles supposées des huiles essentielles sont la paroi des

bactéries, la membrane cytoplasmique et plus particulièrement certaines protéines de surface, le cytoplasme (coagulation et fuite des métabolites et des ions) ainsi que la force proton motrice (Burt, 2004). D'une manière générale, les huiles essentielles sont surtout actives contre les bactéries à Gram positif, mais aussi les bactéries à Gram négatif (Holley et Patel, 2005).

Des substances inhibitrices sont aussi présentes dans les arbres au niveau du bois ou de l'écorce des arbres. Parmi 14 espèces d'arbres feuillus nord américains, 70 à 80 % des extraits d'écorce étaient actifs contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, et *Mycobacterium phlei* (Omar *et al*., 2000). Pour les extraits de bois, 72% étaient actifs contre *S. aureus*, 36% contre *B. subtilis* et 43% contre *M. phlei*. Les extraits étaient aussi en général plus actifs contre les bactéries à Gram positif que contre les bactéries à Gram négatif. Pour les conifères, les substances inhibitrices sont situées principalement au niveau des aiguilles et dans une moindre mesure, au niveau du bois. Kim *et al*. (2000) ont testé les capacités inhibitrices de différents extraits d'aiguilles de pin sur plusieurs bactéries pathogènes. Les fractions aqueuses et butanoliques se sont révélées les plus actives avec des CMI variant de 25 à 45 mg/ml en fonction des micro-organismes (*Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium et *Staphylococcus aureus*). Rauha *et al*. (2000) ont testé l'activité anti-microbienne des extraits méthanoliques d'aiguilles d'épicéa (*Picea abies*) et de phloème de pin sylvestre (*Pinus sylvestris*) par des tests de diffusion. Alors que les extraits d'épicéa n'avaient peu ou pas d'action envers *S. aureus* et *E. coli*, les extraits de pin ont démontré une forte capacité inhibitrice envers *S. aureus*. L'activité anti-microbienne de l'huile essentielle d'épicéa (*Picea excelsa*) a aussi été testée sur les coliformes, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* (Canillac et Mourey, 2001). Les bactéries coliformes (3 *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae* et *Enterobacter cloacae*) se sont révélés résistants à l'action de l'huile essentielle pour une concentration de 10^5 UFC/ml. Par contre, pour *S. aureus* et *L. monocytogenes*, 0,07% d'huile essentielle inhibait la croissance des bactéries en phase stationnaire à 10^5 UFC/ml. Une concentration de 0,2 à 0,3% d'huile essentielle d'épicéa était bactéricide pour 10^5 à 10^7 UFC/ml de *L. monocytogenes* et *S. aureus* en milieu de culture à 37°C. Le bois d'épicéa contient naturellement peu d'huile essentielle, qui provient des aiguilles de l'arbre, et non du bois (Zabel et Morrell, 1992). Elle possède 4 principaux constituants, des terpènes : le β-pinène (26,4%), l'α-pinène (16 ,3%), le limonène (10,9%) et le camphène (8,5%). Elle contient aussi du δ-3-carène (3,9%), du β-phellandène (3,1%), du 1,8-cinéole (2,7%) et des traces de sabinène, d'α-terpinéol et de terpinèn-4-ol (Canillac et Mourey, 2001). Parmi les

composants des huiles essentielles, l'α-pinène est le plus actif contre *Listeria monocytogenes* avec une concentration minimum inhibitrice de 0,019% (v/v) et 0,025 % pour des L. monocytogenes de sérotype 4b et 1/2c (Mourey et Canillac, 2002).

2. Interactions des micro-organismes avec le bois

Une première synthèse sur les interactions entre le bois et les micro-organismes ainsi que sur le statut hygiénique du bois en contact avec les aliments a été réalisée sur 12 articles par Carpentier en 1997. Elle révèle la variabilité des facteurs expérimentaux de ces différentes études, qui peuvent expliquer les différents taux de survie des bactéries observés sur le bois : méthode de contamination, origine et conditions de précultures des micro-organismes traceurs, durée entre la contamination artificielle et l'évaluation de la contamination, essence du bois, orientation des fibres, taux d'humidité et état de surface du bois, méthode de décrochage des micro-organismes. Malgré ces différences, il ressort de cette synthèse que la dessiccation du bois semble entraîner une perte de cultivabilité des micro-organismes provenant des collections, à la différence des souches sauvages, sauf en présence de matière organique. La microflore naturelle apparaît plus résistante que les souches du laboratoire. Du fait de la pénétration des bactéries dans le bois, la méthode de décrochage est un point très important. La supériorité des polymères de synthèse remplaçant le bois n'a pas été démontrée. Un autre point important abordé est la structure poreuse du bois qui rend ce matériau difficile à étudier, car l'humidité du bois est un facteur difficile à maîtriser.

2.1 Contamination naturelle du bois

Certains bois présentent des risques microbiologiques car ils sont naturellement contaminés à des degrés divers par des bactéries à Gram positif et négatif (séquoia et sapin par *Klebsiella pneumoniae* et autres entérobactéries) (Brown et Seidler, 1973 ; Bagley *et al*., 1978 ; Talbot, 1979). Par contre, les planches en épicéa destinées à l'affinage des fromages qui sortent de scieries ont des taux de contamination négligeables (Canillac et Mourey, 2001).

2.2 Survie des micro-organismes après contamination artificielle

Gehrig *et al*. (2000) ont démontré que le bois n'était pas moins hygiénique que le polyéthylène. En effet, dans une atmosphère sèche, 15h après une contamination artificielle avec *E. coli* (10^6 UFC/ml), des boites contact simulant le transfert bactérien, récupéraient moins de bactéries d'une surface en bois que d'une surface en polyéthylène. Le phénomène de séchage a été mis en avant par les auteurs pour expliquer cette différence. Par contre, en atmosphère très humide, les dénombrements des bactéries récupérées par la même technique étaient élevés pour les 2 surfaces. Des observations au Microscope Electronique à Balayage (MEB) ont aussi révélé qu'après une utilisation intensive des surfaces en polyéthylène, elles devenaient rugueuses, avec des anfractuosités. Revol-Junelles *et al*. (2000) ont démontré par mesure d'impédance, qu'aucune bactérie n'était détectée 24 h après la contamination artificielle de $2{,}4 \times 10^2$ *E. coli* sur une caisse en peuplier autoclavée sèche alors qu'un développement bactérien a été observé sur une surface en verre dans les mêmes conditions. Pour un taux d'inoculation supérieur (10^6 *E. coli*), seules quelques bactéries étaient détectées après 145 h d'incubation à 25°C. Pour cette expérimentation, l'humidité au moment de la contamination (après l'autoclavage) était de 17%. La perte de l'activité métabolique des bactéries sur le bois est liée au faible taux d'humidité du bois. Pour Miller *et al*. (1996), des substances contenues dans certains bois peuvent inhiber les flores indésirables. En effet, après 24 h de culture d'*E. coli* O157:H7 inoculée à 7 Log(UFC/ml) en présence d'extrait aqueux de frêne blanc à 37°C, aucune bactérie n'était détectable. Des cultures d'*E. coli* pIE639 et *Enterococcus faecium* en présence de sciures de 7 bois (pin, épicéa, érable, chêne, peuplier, mélèze et hêtre) et de chips en polyéthylène ainsi que le suivi de la survie de ces 2 bactéries sur ces mêmes bois et du polyéthylène ont permis d'émettre des recommandations pour utiliser le bois au contact des aliments : choix des essences (pin, chêne), bonne pratique d'utilisation et stockage au sec (Schönwälder *et al*., 2002 ; Milling *et al*., 2005). En effet, pour ces auteurs, l'activité antimicrobienne du bois est liée aux propriétés hygroscopiques et aux substances contenues dans les extraits aqueux des différentes espèces de bois, probablement des polyphénols (tanins ou flavonoides). Toutefois, Gough et Dodd (1998) ont démontré la possibilité de contaminations croisées pour les planches à découper en bois et en polyéthylène avec une persistance de *S.* Typhimurium plus importante sur le bois surtout s'il est usé.

Le bois peut être favorable à certaines bactéries puisque Kallioinen *et al*. (2003) ont démontré que le bois pouvait être utilisé comme source de carbone par *Pseudomonas* spp, *Acronobacter* spp et *Rahnella aquatilis*. Ces bactéries peuvent en effet se multiplier à partir de chips de bois d'épicéa dans des bioréacteurs sur 7 et 14 jours à 30°C.

2.3 Nettoyabilité du bois étudiée après contamination artificielle

Miller *et al*. (1996) ont comparé la nettoyabilité du bois et du polyéthylène avec de l'eau et différents détergents suite à un contact de 30, 60 et 90 min avec de la viande à 20°C. Ils concluent que le bois est aussi nettoyable voire plus que le polyéthylène. Par étude de la pénétration d'*E. coli* et de spores de *Bacillus subtilis*, Pretcher *et al*. (2002) ont démontré l'importance du sens des fibres de bois (pénétration maximum de 4 et 2,5 mm pour des fibres transversales et longitudinales). Le sens des fibres est tout aussi important pour la nettoyabilité du bois. Ainsi, après contamination par *E. coli* des surfaces de bois coupées longitudinalement et de polyéthylène recouvertes de matière grasse, le nettoyage par brossage à l'eau chaude avec du détergent était aussi efficace sur les 2 matériaux.

D'autres études ont reporté que les polymères inertes étaient significativement plus « hygiéniques ». Ainsi, Welker *et al*. (1997) ont démontré que l'usure des surfaces en bois après plusieurs nettoyages s'est révélée au MEB être plus importante que pour les surfaces en polypropylène. De plus, ce polymère est apparu plus nettoyable que le bois après inoculation de 10^6 UFC d'*E. coli* et analyse par ATPmétrie, suite à un nettoyage à 55°C avec un détergent, suivi d'une désinfection avec 200 ppm d'eau de Javel et un séchage d'1 à 2 h (Welker *et al*.,1997). Pour les auteurs, les surfaces en bois permettent la rétention des bactéries pendant le nettoyage à cause de leur structure poreuse. Pour Tebutt (1991), après contamination par *E. coli*, la surface du bois est en général fortement contaminée avant et après nettoyage (différents protocoles testés, avec ou sans hypochlorite). La présence d'anfractuosités à la surface du bois peut aussi être favorable aux bactéries (Boucher *et al*., 1998). En effet, la structure du bois, notamment les pores et les anfractuosités protégent *Campylobacter jejuni* du stress par aération en culture dans un milieu liquide, agité à 150 rpm, à 30°C. Ainsi, *C. jejuni* a été détecté à 10^5 UFC/ml dans la culture après 28 jours d'agitation, uniquement si des cubes de bois étaient placés dans la culture, alors que les bactéries n'étaient plus détectées à 5 jours d'agitation, en l'absence du bois.

Pour la désinfection, l'utilisation de micro-ondes de 450 à 600 g pendant 3 à 4 min permet une élimination quasi complète des cellules végétatives de *E. coli* , alors que ces ondes n'ont pas d'effet létal sur ces bactéries déposées sur des polymères (Park et Cliver, 1996).

En conclusion, sur la base des études décrites dans cette partie, la supériorité des polymères de synthèse sur le bois n'est toujours pas démontrée : la multiplicité des facteurs et la différence des conditions d'études ne permet pas de conclure, comme le suggérait déjà Carpentier (1997). Plusieurs facteurs apparaissent déterminants pour la survie ou l'inhibition des micro-organismes et la nettoyabilité du bois : la surface irrégulière, qui peut rendre le bois difficilement nettoyable, la porosité qui permet la pénétration des micro-organismes en profondeur mais aussi l'inhibition des micro-organismes par dessiccation en atmosphère sèche, et la présence de molécules inhibitrices pour certaines essences.

Plusieurs recommandations ont ainsi émergé de toutes ces études : une coupe longitudinale du bois pour diminuer la pénétration des micro-organismes, le choix d'essences spécifiques pour leur molécules inhibitrices et un stockage au sec pour favoriser la dessiccation du bois.

3. Ecologie microbienne de biofilms à la surface du bois

L'écologie microbienne de biofilms implantés et maintenus dans un but technologique sur un support bois est un sujet très peu abordé dans la littérature scientifique, ainsi que la présence de bactéries pathogènes sur le support bois, dans des conditions réelles d'utilisation. A notre connaissance, uniquement 7 études ont été réalisées sur le sujet. Elles sont détaillées dans cette partie en fonction du secteur de production agro-alimentaire.

3.1 Production de boissons alcoolisées

Swaffield *et al*. (1997) ont étudié l'écologie microbienne de fûts de cidre en chêne, et la première partie de cette étude a consisté en un dénombrement des bactéries lactiques, des bactéries acétiques et des levures à l'intérieur de fûts en bois et en résine, avant et après nettoyage (à haute pression avec un rinçage à 60°C). Le décrochage a été effectué par écouvillonnage. Le bois apparaît plus colonisé que la résine epoxy : 3 à 7 Log(UFC/cm²) pour la FMAR dénombrée sur le bois et 3 à 6 Log(UFC/cm²) sur la résine epoxy. La proportion de bactéries lactiques et

acétiques est plus importante pour le bois, et pour les deux supports, il n'y a pas de différence entre les stades avant et après nettoyage. Dans un deuxième temps, la colonisation microbienne d'un morceau de bois plongé dans un fut de cidre rempli a été étudiée. Dès deux semaines, la pénétration des micro-organismes est effective en surface, puis elle progresse et une implantation microbienne est démontrée à 2,5 mm et à 12 mm de profondeur après quatre et dix semaines de contact. Enfin, l'influence des profils microbiens des biofilms colonisant le bois a été démontrée sur les molécules constituant le goût du cidre, principalement les acides malique et lactique.

3.2 Produits laitiers

3.2-1 Bois et flores d'intérêt technologique

Richard (1997) a démontré par microscopie électronique à balayage, la présence de nombreuses levures et bactéries à la surface d'une gerle de bois préalablement mise en contact quotidiennement avec du lactosérum et utilisée pour la fabrication de fromage salers pendant 3 jours. Par la suite, Mounier *et al*. (2006) ont étudié les origines des flores retrouvées sur la surface d'un fromage à croûte lavée (gubbeen cheese), par analyse en électrophorèse en champ pulsé des flores de la surface du fromage, de l'environnement des fromages, et des mains du personnel. La source principale n'a pas été identifiée, mais les solutions de lavages étaient une source importante de *Staphylococcus saprophyticus* et *Debaryomyces hansenii*, et les mains du personnel de *Corynebacterium casei* et *C. variabile*, 4 flores dominantes de cette étude. Sur les planches en bois, après 3 jours d'affinage, 4 Log(UFC/cm²) de levures pouvaient être dénombrées, principalement *D. hansenii*, la levure dominante sur les fromages, ainsi que 5 Log(UFC/cm²) de bactéries. Sur des supports en acier inoxydable, des bactéries et des levures ont aussi été retrouvées, mais le calcul de la population au cm² n'a pu être effectué. Sur ces supports en acier inoxydable, très peu de bactéries ont été identifiées, alors que *C. variabile*, *C. casei*, *Microbacterium gubbeense* et *Agrococcus* sp. ont été identifiées sur les planches en bois. Les populations bactériennes à la surface des planches en bois étaient donc similaires à la population de la surface du fromage. Dans cette étude, l'influence des planches en bois sur la colonisation de la surface du fromage n'a pas pu être étudiée, mais les auteurs indiquent que les planches en bois sont une source potentielle de la flore de surface du fromage. Ils soulignent la

perte technologique potentiellement engendrée en cas d'utilisation de support en acier inoxydable.

L'étude ACTIA n°RA 97.31 (ITFF, 2000) « Evaluation et maîtrise du risque microbiologique dans l'utilisation du bois pour l'affinage des fromages », réalisée par l'ITFF, s'est principalement intéressée aux biofilms présents sur les planches d'affinage en bois. Parmi les résultats importants de cette étude, il faut noter tout d'abord qu'après décrochage par brossage des surfaces de planches d'affinage de reblochon de Savoie, de tomme de Savoie, de fromage à raclette et d'emmental, les flores majoritaires retrouvées sur les planches sont les bactéries corynéformes, les staphylocoques à coagulase négative, les microcoques et les levures-moisissures. Ce sont les flores caractéristiques de la surface des fromages dont les supports d'affinage ont été étudiés. Ensuite, la colonisation des planches d'affinage par les micro-organismes se limitait uniquement aux 2 premiers millimètres de profondeur, avec une décroissance considérable dès le premier millimètre. En effet, les dénombrements de la flore caractéristique de la surface des fromages étaient de 5 à 9 Log(UFC/cm²) en surface et de 2 à 3 Log(UFC/cm²) à 0,4 mm de profondeur. Pour ce qui est de la spécificité du matériau bois dans l'affinage du fromage, il a été démontré que le matériau support d'affinage influençait la qualité des croûtes de fromages. Ainsi, un affinage sur un état de surface lisse (par exemple, planche de mélaminé ou surface rabotée) entraîne la formation de croûtes poisseuses, particulièrement visibles pour les tommes de Savoie et dans une moindre mesure pour les reblochons de Savoie. Dans cette étude, par comparaison des masses des planches, des transferts hydriques de l'humidité ambiante de la cave vers la planche mais aussi du fromage vers la planche ont été démontrés.

Ces deux dernières études sont les premières à notre connaissance à évoquer et étudier le potentiel technologique des planches d'affinage en bois en fromagerie. Leurs conclusions communes sont la correspondance forte entre les flores de surfaces des fromages et les flores présentes à la surface des planches d'affinage ainsi que la perte technologique en cas d'utilisation d'autres supports que les planches traditionnellement utilisées.

3.2-2 Bois et flores pathogènes

Toujours dans l'étude ACTIA réalisée par l'ITFF, la présence de différentes bactéries pathogènes a été recherchée sur les planches de différentes productions fromagères. Après des prélèvements par brossage de 25 cm², réalisés sur 32 planches d'affinage, aucune flore pathogène n'a été retrouvée, dans 10 ml de suspension de décrochage pour *Listeria monocytogenes* et de salmonelles, et à un seuil de 10 UFC/cm², pour *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli*. Ce résultat est particulièrement intéressant, car parmi les productions fromagères dont les planches analysées provenaient, abondance, beaufort, tomme de Savoie, reblochon et vacherin mont d'or, les deux dernières productions sont plus exposées au danger *Listeria*.

Menendez *et al*. (1997) ont effectué des recherches de *L. monocytogenes* pendant 10 mois, dans une usine de fabrication de fromages (surfaces, lait, produits, machines, gants, eau, sols), dans 10 ml pour les liquides et 400 cm² décrochés par chiffonnettes pour les surfaces. 46 échantillons sur 311 contenaient des *Listeria* spp et sept échantillons contenaient des *L. monocytogenes*. Ces sept échantillons comprenaient une surface de planche d'affinage en bois (sur cinq analysées), ainsi qu'un échantillon de lait cru (sur vingt analyses), deux surfaces de machine à emballer (sur douze analyses) et de machine à convoyer (sur neuf analyses), une surface de moule (sur cinq analyses) et deux surfaces de sols (sur quatorze analyses). Les auteurs n'ont pas cherché à déterminer les sources de contamination par *L. monocytogenes*. Cette étude ne précise pas la simultanéité potentielle des échantillons positifs ni les procédures de nettoyage et désinfection mises en place dans cette usine. Silva *et al*. (2003) ont aussi effectué des recherches de *L. monocytogenes* dans 2 usines d'un fromage frais brésilien. Sur un total de 218 échantillons, 31 contenaient des *Listeria* spp et seulement 2 des *L. monocytogenes*. Ces 2 derniers échantillons provenaient d'1 échantillon de lait cru et d'1 échantillon de sol d'une seule usine. *Listeria* n'a pas isolée sur les 5 échantillons de planches en bois testés au cours de cette étude.

Une autre étude a été consacrée aux phénomènes de contaminations entre les fromages et les planches. Sur la surface de fromages taleggio, Carminati *et al*. (2000) ont déposé 3 Log(UFC) par fromage de *L. innocua* après 2 ou 4 semaines d'affinage. Après 7 semaines d'affinage avec une inoculation à 2 semaines d'affinage, *L. innocua* avait colonisé toute la surface du fromage (5,09 Log(UFC) par fromage), des contaminations croisées avec d'autres fromages affinés

ensemble ont été observées (3,52 Log(UFC) par fromage) ainsi que sur 2 supports en bois sur 4, à priori par la solution de lavage des fromages. Par contre, après 7 semaines d'affinage mais avec une inoculation à 4 semaines d'affinage, *L. innocua* n'avait pas colonisé la totalité de la surface (3,75 Log(UFC) par fromage) et moins de contaminations croisées ont été observées (souvent au seuil de détection de 0,89 Log(UFC/cm²)). Pour une inoculation à 4 semaines, *Listeria* a été trouvée dans les eaux de lavages des fromages 5 jours après la contamination, mais pas par la suite, et elle n'a pas été retrouvée sur les supports en bois. Dans cette étude, les supports en bois avaient été préalablement décontaminés avec de la javel (200 ppm pendant 30 min). La population totale à la surface du fromage peut expliquer les différences de dissémination du pathogène. En effet, les contaminations croisées étaient moins présentes lorsque *Listeria* était inoculée sur des fromages à 4 semaines d'affinage, avec une population totale de surface supérieure de 2 Log(UFC) aux fromages à 2 semaines d'affinage. Sur les fromages, Carminati *et al*. ont donc démontré que l'effet anti-*Listeria* était lié à l'importance de la population, et les auteurs suggèrent des mécanismes de compétition nutritionnelle ou de synthèse de molécules toxiques, bactériocines ou acides organiques.

Ainsi, le potentiel technologique et les avantages du bois en fromagerie commencent à être évoqués dans des études scientifiques. Les relations entre le bois et les flores pathogènes sont aussi abordées dans un contexte de fromagerie. Des études scientifiques supplémentaires sur le bois et son utilisation en contexte agro-alimentaire sont néanmoins nécessaires pour donner au législateur les éléments pour établir une réglementation précise et fondée.

Le champ d'investigations scientifiques autour du bois est encore très large à ce jour. Sa composition chimique et sa structure lui confèrent des propriétés spécifiques particulières, dont les implications microbiologiques sont encore à établir. En effet, la complexité de l'étude de ce matériau (multiplicité des facteurs et des conditions d'utilisation) est à l'origine de la divergence des conclusions des études réalisées.

Malgré le faible nombre d'études scientifiques publiées et la diversité des facteurs testés, il ressort le paradoxe suivant : (i) la structure poreuse du bois est à l'origine de ses principales propriétés en fromagerie : la régulation de l'humidité et l'hébergement des flores d'intérêt technologique, (ii) cette dernière est aussi à l'origine de la faible nettoyabilité du bois, et donc de

la prudence des autorités sanitaires, (iii) en contre partie, cette structure poreuse assure aussi au bois sa capacité de dessiccation, responsable d'un environnement défavorable pour les bactéries.

Le bois est donc un matériau traditionnellement utilisé pour la fabrication des aliments, dans des domaines divers. Chaque domaine exploite une ou plusieurs propriétés du bois avec des conditions d'utilisation spécifiques. L'utilisation du bois au contact des aliments doit donc faire l'objet de travaux adaptés à chaque situation d'emploi (présence d'un biofilm, taux d'humidité ambiante, séchage, essence de bois utilisée…).

Bilan de l'étude bibliographique

Plusieurs constats peuvent être émis à la suite des travaux qui ont été présentés dans ce chapitre :

- La listériose est une maladie d'origine alimentaire dont le taux de létalité est proche de 30%. Elle peut être transmise par de nombreux aliments, dont les produits laitiers et plus particulièrement certains fromages. La contamination des fromages par cette bactérie peut avoir lieu à toutes les étapes, de la fabrication au conditionnement, principalement à cause du caractère ubiquiste de *L. monocytogenes.* La maîtrise de ce pathogène dans les ateliers agro-alimentaires est donc un enjeu majeur.

- En plus de la désinfection chimique, les biofilms positifs peuvent entrer en jeu dans la maîtrise sanitaire de *L. monocytogenes*. En effet, de nombreuses interactions microbiennes sont défavorables à l'implantation et au développement de *L. monocytogenes*. Ainsi, les bactéries présentes sur des surfaces inertes et sur des aliments, notamment les flores d'intérêt technologique, peuvent donc être employées comme une barrière supplémentaire à la contamination par *L. monocytogenes*.

- Malgré son utilisation traditionnelle en agro-alimentaire, le bois a fait l'objet de peu de travaux scientifiques publiés sur les interactions bois/bactéries, pour les flores d'intérêt technologique et pathogènes. De plus, la multiplicité des facteurs pour l'étude du bois (essence, taux de séchage, état de surface, coupe, conditions d'utilisation spécifiques…) ont pour conséquence la divergence des résultats des études sur ce sujet et la poursuite du régime dérogatoire toujours en vigueur pour l'utilisation du bois au contact alimentaire.

Dans la mesure où des flores d'intérêt technologique du fromage ont été identifiées sur les planches d'affinage et au vu de l'influence défavorable de ces mêmes flores sur *L. monocytogenes*, les travaux de cette thèse ont été consacrés à l'étude de la triade « bois-flores d'intérêt technologique-*L. monocytogenes* » (Figure III.2).

Cette thèse a donc pour objectifs de caractériser l'écosystème de surface des planches d'affinage et de vérifier l'hypothèse selon laquelle les planches d'affinage en condition d'utilisation, avec un biofilm, sont capables d'empêcher ou de minimiser l'implantation de *Listeria monocytogenes*.

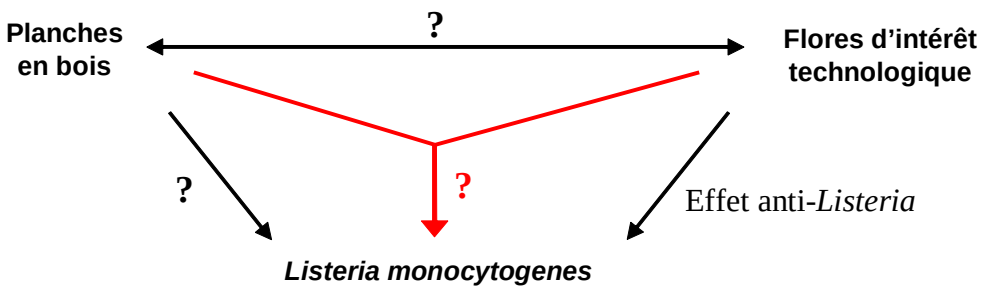


Figure III.2. Schéma des connaissances actuelles des interactions entre les planches en bois, les flores d'intérêt technologique et *L. monocytogenes* (flèches noires) et objectif de la thèse : « étude du comportement de *L. monocytogenes* sur des planches en bois colonisées par les flores d'intérêt technologique » (flèche rouge).

Il a été décidé de travailler dans cette étude avec le reblochon de Savoie, fromage au lait cru, à pâte légèrement pressée et à croûte mixte. En effet, les connaissances antérieures acquises sur ce fromage, sa durée d'affinage plus courte que d'autres fromages aussi sensibles à *Listeria*, et la proximité géographique de 2 des laboratoires (LRGIA, Bourg en Bresse, et Leamil, La Roche sur Foron) étaient autant d'atouts favorables à ce choix. Ce travail peut être résumé en 4 parties :

- La première partie du travail correspondait à la description précise du processus d'affinage mis en place par l'affineur partenaire. L'objectif de cette partie était de connaître les conditions environnementales des biofilms présents sur les planches d'affinage en caves, et de cerner les facteurs du processus d'affinage ou de l'environnement qui peuvent influencer la composition microbienne de ces biofilms. La synthèse des données récoltées sur le terrain a été à l'origine de la sélection des facteurs (origine des fromages, âge des planches) et des caractéristiques des planches avec lesquelles le travail a été effectué.

- Les objectifs de la deuxième partie étaient la caractérisation de l'écosystème et l'identification des sources de variations de la composition microbienne de cet écosystème. Suite à une phase de mise au point méthodologique, la description des biofilms présents sur les planches d'affinage sélectionnées et de leur environnement, d'un point de vue microbiologique, physico-chimique et biochimique a permis d'évaluer les différences entre ces biofilms, et de valider les principaux facteurs de variations proposés dans le premier chapitre de résultats.
- Dans un troisième temps, le comportement de *L. monocytogenes* a été évalué sur différentes planches d'affinage, choisies en fonction des facteurs de variation des biofilms déterminés dans la partie précédente. L'objectif de cette partie était de vérifier l'hypothèse selon laquelle les planches d'affinage en présence du consortia de surface sont capables de limiter l'implantation de *L. monocytogenes*. Le suivi du comportement de *L. monocytogenes* a été réalisé en laboratoire, dans les conditions proches des caves d'affinage, décrites lors de la première partie.
- Enfin, la dernière partie a été consacrée à la reproduction de l'effet anti-*Listeria* en conditions de laboratoire avec pour objectif la mise en place de modèles pour essayer de reproduire et comprendre ses mécanismes d'actions de l'effet anti-*Listeria*.

PRESENTATION DES RESULTATS

Chapitre 1. Description du cadre de l'étude : L'AOC « Reblochon de Savoie », processus de production et d'affinage

Pour cette étude, un seul affineur de reblochon de Savoie a été sélectionné de manière à simplifier la collecte des planches tout en conservant une certaine diversité. En effet, dans la filière reblochon, les affineurs achètent des jeunes fromages à affiner à différents producteurs. Deux critères ont été pris en compte pour le choix de l'affineur. Tout d'abord, l'affineur partenaire sélectionné fait partie de ceux qui utilisent des planches en bois pour l'affinage des reblochons. Parmi ceux-ci, il est le seul à mettre en place une phase d'affinage sur planche aussi longue (environ 2 semaines). De plus, il est très attaché à la constance de la qualité de ses produits finis. L'adaptation permanente de son processus d'affinage à chaque lot de fromages qu'il affine (choix du jour de lavage, de la durée d'affinage) lui assure une maîtrise de la qualité finale de ses fromages.

Au cours de ce chapitre, dans une première partie, le processus de fabrication du reblochon de Savoie a été rappelé afin de décrire les fromages placés en contact avec le sujet de notre étude : les planches d'affinage. L'environnement et la gestion de ces planches ont ensuite été décrits dans une deuxième partie, consacrée au processus d'affinage modèle de notre étude. L'objectif de cette partie est l'analyse des conditions environnementales et des évènements subis par les planches afin de déterminer les facteurs qui peuvent influencer la composition microbienne des consortia de surface des planches.

I. Le reblochon de Savoie : description et premiers stades de fabrication

Parmi les premiers fromages à obtenir une Appellation d'Origine Contrôlée (AOC) en 1958, le reblochon de Savoie est un fromage au lait cru et entier, à pâte légèrement pressée, non cuite et faiblement salée (Figure I.1), produit en Savoie et Haute Savoie, de la chaîne des Aravis au pays

Rochois et au Val d'Abondance. D'un diamètre de 14 cm pour une hauteur de 3,5 cm, il doit contenir au minimum 45 g de matière grasse pour 100 g de matière sèche et sa teneur en matière sèche ne doit pas être inférieure à 45 g pour 100 g de fromage. En 2000, la production a dépassé les 17.000 tonnes, ce qui place le reblochon en tête de vente des fromages savoyards (beaufort, tomme de Savoie, emmental savoyard et abondance) (Leseur, 2006). Le reblochon peut être laitier, distingué par une plaque d'identification en caséine rouge, s'il est préparé dans des fruitières avec un mélange de laits issus de différentes exploitations ou fermier, avec une plaque de caséine verte, s'il est fabriqué dans la ferme du producteur, avec le seul lait issu de l'exploitation. En 2006, 160 producteurs de reblochon fermier fabriquaient 3.500 tonnes de fromage contre 13.500 tonnes de reblochon laitier, fabriqués par 20 entreprises artisanales ou industrielles transformant le lait de 800 producteurs. Pour ce fromage, seul le lait de trois races de vache est autorisé : l'abondance, la tarine et la montbéliarde. Leur alimentation est obligatoirement constituée d'herbe pâturée pendant la période estivale et de foin distribué à volonté en période hivernale. Les 2 types de reblochon sont ensuite fabriqués selon le décret du 15 novembre 1999 relatif à l'appellation d'origine contrôlée « Reblochon de Savoie ». Les modalités de fabrication sont différentes entre les reblochons laitiers et fermiers, en revanche, les modalités de production du lait et d'affinage sont identiques.

Figure I.1. Le fromage AOC « Reblochon de Savoie », photo réalisée par le SIR

Pour le reblochon fermier, la fabrication est réalisée avec le lait d'un seul troupeau sur le lieu de traite. La traite a lieu deux fois par jour, le matin et le soir, suivie de la fabrication du reblochon, sans réfrigération du lait. Il est tout d'abord ensemencé avec des ferments produits par le Syndicat Interprofessionnel du Reblochon (SIR) : *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* et assez souvent *Lactococcus lactis* et *L. lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis* ainsi que très rarement *Geotrichum candidum*. Cette levure est utilisée pour ensemencer le lait surtout au printemps et à l'automne, lorsque les producteurs vont ou reviennent des alpages et fabriquent les fromages dans des locaux d'affinage non utilisés pendant plusieurs mois. Ensuite, il est emprésuré, puis détaillé après environ 30 min, c'est à dire, découpé délicatement à l'aide d'un tranche–caillé jusqu'à obtention de grains de caillé allant de la taille de grains de blé à celle de grains de maïs. L'ensemble est ensuite faiblement chauffé et brassé (34-35°C) et les grains de caillé sont répartis dans des moules tapissés d'une toile de lin (Figure I.2a). Le reblochon y prend sa forme. Un poids (1,5 à 2kg) posé pendant au minimum 6 heures sur le fromage permet de terminer l'égouttage et de presser légèrement la pâte. Le reblochon est ensuite démoulé (Figure I.2b) et salé, à la main au sel fin (chlorure de sodium) ou plus généralement en saumure (densité de 1130 à 1140).

Figure I.2. Fabrication du reblochon : répartition dans les moules (a) et démoulage (b). Photos réalisées par le SIR

La surface du fromage peut être pulvérisée avec *Geotrichum candidum* et *Debaryomyces hansenii*. Puis, il est mis en séchoir (cave de pré-affinage) sur des supports en bois (planches), en plastique (cagettes) ou en acier inoxydable (claies) à une température de 16 à 18°C et une humidité de 95% HR pendant environ une semaine. Il est retourné tous les jours et il subit un premier lavage avec une solution salée. Il est ensuite transféré en cave d'affinage chez un affineur après un minimum de 10 jours sur l'exploitation.

Le reblochon constitue une transition technologique entre pâte molle et pâte pressée. En effet, selon la définition réglementaire, un fromage à pâte molle est caractérisé par un pourcentage de teneur en eau dans le fromage dégraissé supérieur à 67%. Au début de l'affinage, le reblochon est une pâte molle puis sa teneur en eau décroît au cours de l'affinage et passe en dessous de cette barre des 67%. Par la suite, durant l'affinage, les reblochons vont être lavés une à deux fois, pour favoriser l'installation homogène des bactéries corynéformes et de *Geotrichum candidum*. Les fromages vont ainsi avoir une croûte mixte spécifique caractérisée par une couleur jaune à jaune orangée (bactéries corynéformes) et recouverte d'une mousse blanche (*Geotrichum candidum*). A la fin de l'affinage, au stade de la consommation, la croûte du reblochon a un pH légèrement acide (entre 5,5 et 5,7) et le fromage contient environ 1,3 à 1,6 % (m/m) de chlorure de sodium, avec un extrait sec de 50% (m/m) et un Gras sur Sec (G/S) de 50% (m/m) (Communication personnelle, B. Mathieu, SIR).

Ainsi, le reblochon est exposé au danger *Listeria* par sa matière, le lait cru et ses premières étapes de fabrication (faible pressage) qui l'apparente à un fromage de type pâte molle avec une survie possible de *L. monocytogenes*. Par la suite, les procédures d'affinage (lavages avec une solution salée) créent une élévation du pH de surface et des conditions favorables au développement de *L. monocytogenes* (cf Tableau I.6 du chapitre 1 de la bibliographie).

II. L'affinage du reblochon de Savoie chez l'affineur partenaire.

L'affineur partenaire achète les fromages à 20 producteurs fermiers, du 10ème au 12ème jour après la fabrication des fromages. Ils sont affinés dans ses locaux pendant 4 à 6 semaines. Durant les

13 à 16 premiers jours, ils sont affinés sur des planches en bois dans différentes caves, puis pendant 15 jours à 1 mois, emballés individuellement, rangés dans des caisses en bois.

La description des caves et du processus d'affinage est une première étape primordiale du travail à effectuer. Elle a été réalisée sur la base d'un questionnaire (Annexe 1). En effet, cette description va permettre de caractériser l'environnement des planches d'affinage dans les conditions réelles : les caves d'affinage. Ensuite, la synthèse des informations obtenues va déterminer des facteurs du processus ou de l'environnement qui peuvent influencer les biofilms présents sur les planches d'affinage, par exemple, les procédures de nettoyage, les contacts avec les fromages, la nature de la planche, ou les cycles d'utilisation des planches. Cette étape correctement réalisée garantit aussi le lien et l'interconnexion entre les résultats obtenus au laboratoire et leurs applications futures en caves d'affinage.

1. Description des caves

La procédure d'affinage classique sur planches mise en place par l'affineur se compose de plusieurs étapes situées dans 3 caves différentes. En effet, grâce au système des rayonnages sur roulettes sur lesquelles reposent les planches (Figure I.3), les fromages sont facilement déplacés et suivent le même parcours dans les caves comme le montre la Figure I.4. Les caves d'affinages on été construites en 2000, elles sont voûtées, en briques recouvertes de chaux (Figure I.5). Lors de la création des caves, elles ont été longuement arrosées et ensemencées avec du *Geotrichum candidum* et depuis tous les ans, les murs sont enduits de chaux éteinte. Les caractéristiques de chaque cave sont reportées dans le Tableau I.1. Il est intéressant de noter que les valeurs d'hygrométrie (aux alentours de 95% RH), de température (autour de 12°C) sont relativement proches d'une cave à l'autre. En effet, les portes entre les différentes caves restent ouvertes durant la journée. Le système d'humidification des caves par ultrasons permet une bonne maîtrise de l'humidité des caves. Les teneurs en dioxyde de carbone et ammoniaque ont été estimées dans les 3 caves avec un système de détection de gaz « Accuro » (Dräger, Strasbourg, France) : environ 7,5 g/m^3 de dioxyde de carbone et moins de 3,5 mg/m^3 pour l'ammoniaque. Blanc *et al.* (1982) ont démontré que 60 à 80% de l'ammoniaque et 87 % du dioxyde de carbone ambiants des caves de gruyère provenaient de l'activité microbienne de la morgue de celui-ci. Ainsi, la forte teneur en dioxyde de carbone peut s'expliquer par la présence importante de

levures à la surface des reblochons qui métabolisent le lactate en acétate et en dioxyde de carbone. L'ammoniaque, qui est le produit final du catabolisme des acides aminés, est en très faible concentration dans les caves. Cela confirme une activité plus levurienne que bactérienne sur la croûte des fromages. L'affinage court du reblochon explique en partie la dominance d'une activité métabolique plus fermentaire que protéolytique.

Tableau I.1. Caractéristiques de l'air ambiant des 3 principales caves de l'affineur partenaire.

	Température (valeurs moyennes)	Système de climatisation	Hygrométrie (valeurs moyennes)	Système d'humidification
Cave 1	11℃	eau glycolée	94%	ultrasons
Cave 2	13℃	eau glycolée	96%	ultrasons
Cave 3	13℃	eau glycolée	97%	naturelle

Figure I.3. Reblochons en caves d'affinage sur les rayonnages.

Figure I.5. Les caves d'affinage : voûtées, en briques, recouvertes de chaux

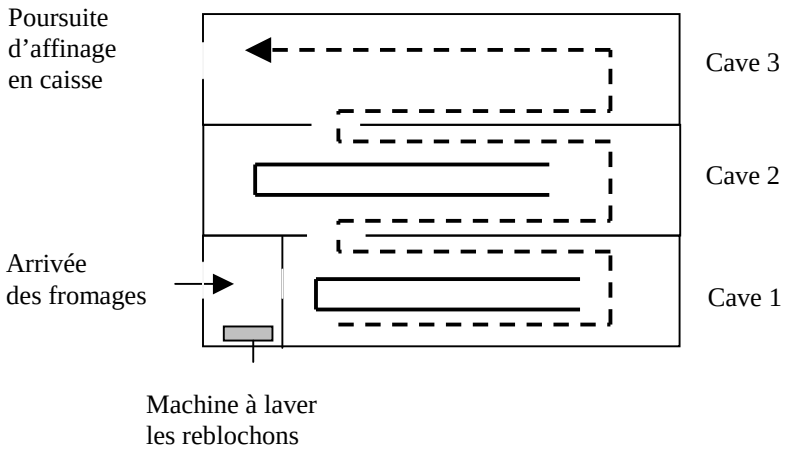


Figure I.4. Schéma d'organisation des 3 principales caves avec le trajet des fromages (– –) et le système d'humidification (——)

2. Affinage des fromages

Chez l'affineur partenaire de notre étude, les fromages d'un même producteur ou origine, arrivent 2 à 3 fois par semaine (Figure I.6). Dès leur arrivée, les lots de fromage sont divisés en sous lots en fonction de leur humidité, qui correspond au jour de fabrication. Ils sont ensuite placés sur des planches en bois dans la cave 1, où ils vont rester environ 1 semaine (Figure I.7). Dans la cave 1, les fromages sont retournés tous le jours et les planches retournées un jour et changées le lendemain. La surface du fromage est donc mise en contact tous les jours avec une surface de planche nettoyée et séchée, l'objectif étant de finir de sécher les fromages. Chaque sous-lot de fromages est aussi lavé généralement une fois au cour de cette semaine avec une machine à laver les reblochons (Figure I.8) et une solution composée de 6 litres de lait pasteurisé, 6 litres d'eau, 150 g de chlorure de sodium et 6 cuillerées à café de colorant. Le jour du lavage du sous-lot se décide en fonction de l'humidité des fromages, après appréciation tactile et visuelle réalisée chaque matin par l'affineur. Dans la cave 1, l'évolution de la surface des fromages correspond l'apparition d'un feutrage blanc, caractéristique de *Geotrichum candidum*. Les fromages passent ensuite en cave 2 pendant 2 jours puis en cave 3 pendant 4 à 7 jours. Dans ces 2 caves, les fromages sont retournés tous les 2 jours mais les planches ne sont pas changées. Le biofilm présent sur les planches reste donc en contact 6 à 9 jours consécutifs avec un même fromage en caves 2 et 3. Dans ces caves, la surface des fromages se caractérise par l'apparition de la couleur orange, typique du reblochon.

Apres l'affinage sur planches, les fromages sont ensuite emballés entre deux disques d'épicéa, ou faux-fonds, et dans du papier paraffiné, puis placés dans des caisses en bois pour la fin d'affinage en cellules (Figure I.9). Ils passent successivement dans 2 cellules de températures différentes, avec une première cellule à 4°C où ils sont stockés de 10 à 21 jours. Ensuite, en fonction de l'avancement de l'affinage, les fromages peuvent être placés dans 2 cellules à 11 ou 15°C pendant 4 à 7 jours. Ils sont ensuite ré-emballés entre deux faux-fonds en épicéa dans du papier kraft paraffiné, puis vendus directement à des crémeries sur tout le territoire national.

Figure I.6. Reblochons en fin de séchoir, à l'arrivée dans les caves de l'affineur partenaire

Figure I.7. Reblochons en cave d'affinage 1.

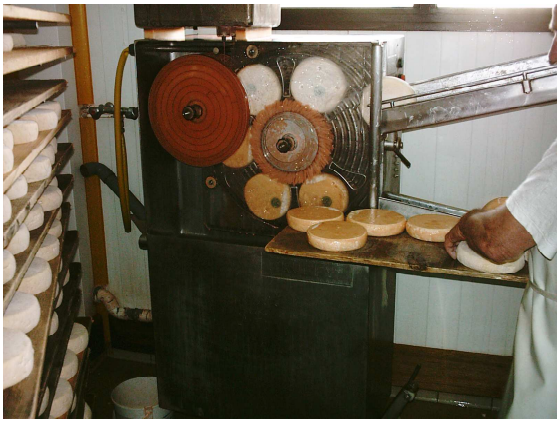


Figure I.8. Machine à laver les reblochons

Figure I.9. Reblochons emballés entre 2 faux-fonds en épicéa dans du papier paraffiné, et rangés dans des caisses en bois

Les flores de surface du reblochon de Savoie ont été analysées lors de 2 études réalisées avec la participation de l'ITFF, l'une publiée (Bärtschi *et al*., 1994) sur la flore fongique de surface du reblochon et la deuxième lors du programme européen SCM (Etude Smear Cheese Microflora Projet QLK1-CT-2001-02238 « Biodiversity and anti-Listerial activity of surface microbial consortia from Limburger, Reblochon, Livarot, Tilsit ans Gubbeen cheese, 2002-2004). L'étude sur la flore fongique de surface a révélé que les levures dont *Geotrichum candidum* se développaient principalement pendant la phase de séchoir, avant le premier lavage avec la solution salée. Parmi les 13 levures dominantes identifiées, les plus répandues était *Geotrichum candidum* et *Debaryomyces hansenii*. L'étude SCM a étudié l'évolution des flores bactériennes et levuriennes à la surface du reblochon à 3 stades différents : en sortie de saumure (J1), avant le premier lavage (J7), et en fin d'affinage (J17). Les principaux résultats de cette étude sont résumes sur la Figure I.15. Les bactéries et les levures isolées ont été identifiées par différentes méthodes : par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF), par rep-PCR (repetitive extragenic palindromes Polymerase Chain Reaction), par analyse de la séquence ARNr 16S (Acide Ribonucléique) et par analyse SDS-PAGE (Sodium Dodécyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis) des protéines des micro-organismes. Cette étude a confirmé le développement important des levures durant la phase de séchoir (de 5,2 à 7,5 Log(UFC/cm²)) et la prédominance de *G. candidum*. En revanche dans cette étude, *Kluyveromyces lactis* était aussi une levure dominante et non plus *D. hansenii*. Pour les bactéries, un développement important a aussi été mis en évidence pendant la phase de séchoir, de 6,6 à 8,4 Log(UFC/cm²). Cette étude a démontré un changement de profil entre le séchoir où les bactéries majoritaires sont des bactéries à Gram positif et catalase négative et la phase d'affinage proprement dite ou les bactéries majoritaires sont des bactéries corynéformes (Gram positif et catalase positive). Le développement des bactéries corynéformes est à relier avec l'augmentation du pH de surface de 5,3 à 6,6, et la formation de la croûte orangée du fromage (augmentation de la matière sèche des 2 premiers millimètres de la surface du fromage de 48,9 à 56,7 g/100g). Parmi les bactéries corynéformes, *Corynebacterium variabile* était l'espèce la plus abondante.

L'évolution des flores de surface des fromages à croûte lavée du type munster, tilsit, limburger, taleggio ou livarot, est similaire au reblochon pour les premières étapes : les levures et les moisissures dominent dans un premier temps les surfaces des fromages car ces micro-organismes sont acido-résistants et halotolérants. Par contre, en fin d'affinage les bactéries du genre

Brevibacterium, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* sont les micro-organismes dominants (Eliskases-Lechner et Ginzinger, 1995 ; Galli *et al*., 1996 ; Gobetti et Corsetti, 1997 ; Valdes-Stauber *et al*., 1997). En effet, au début de l'affinage, les levures métabolisent le lactate en acétate et en dioxyde de carbone. Elles peuvent aussi produire des métabolites alcalins, notamment, l'ammoniaque. Ces métabolites désacidifient la surface du fromage permettant le développement de flores halotolérantes mais moins acido-résistantes, à Gram positif et catalase positive comme les *Staphylococcus* à coagulase négative et les bactéries corynéformes. Les fromages à croûte lavée sont ensuite régulièrement frottés avec une solution de lavage salée contenant des flores de surface de fromages plus anciens, ce qui favorise l'implantation et le développement des flores halotolérantes (Corsetti *et al*., 2001). Dans le cas du reblochon, uniquement 1 à 2 lavages avec une solution faiblement salée interviennent au début de l'affinage. Comme *Geotrichum candidum* fait partie des levures les moins résistantes au chlorure de sodium (croissance pour des concentrations de NaCl inférieures à 4% (m/v), Tempel et Nielsen, 2000), l'absence de lavages en deuxième partie d'affinage favorise son développement.

Sur la Figure I.10, les différents stades d'affinage du reblochon jusqu'à la consommation sont représentes et les transformations liées à ce processus bien visibles : affaissement du fromage du à la protéolyse et à la lipolyse, transformation de la surface du caillé en croutage caractéristique, grâce au développement des flores technologiques de surface (*Geotrichum candidum* pour le feutrage blanc, bactéries corynéformes pour la couleur orangée).

Figure I.10. Evolution du reblochon pendant l'affinage : en fin de séchoir, en fin de cave 1, en cave 2, en fin de cave 3 et à la consommation

3. Gestion des planches

Les planches utilisées pour l'affinage sont en épicéa (*Picea abies* : *Picea excelsa*), mesurent 110 cm x 30 cm x 1.2 cm et sont coupées dans le sens longitudinal du bois, sans rabotage. En 2004, plus de 2000 planches étaient régulièrement utilisées, âgées de 6 mois à 14 ans. L'âge des

planches correspond à leur durée d'utilisation dans les caves d'affinage. Elles peuvent être classées en 3 catégories d'âges, représentées sur la Figure I.11 : jeunes (moins de 4 ans), d'âge moyen (de 4 à 8 ans), et vieilles (plus de 8 ans), respectivement, 15%, 34% et 51% de l'effectif total du stock. Cette classification a été réalisée sur la base des observations de l'affineur sur l'aptitude des planches à sécher les fromages. Les jeunes planches ont tendance à sécher trop rapidement les fromages. Les planches d'âge moyen ont les meilleures aptitudes de séchage des fromages. En revanche, les planches après 8 ans d'utilisation ont tendance à perdre leur capacité de séchage. Les empreintes, zones de contact entre les fromages et la planche, sont de plus en plus visibles avec l'âge de la planche. Une coloration sombre apparaît, uniquement en surface de certaines planches, due à l'oxydation des phénols de la surface (Figure I.11). L'importante proportion de vieilles planches s'expliquent par un gros investissement en planches lors de la création de l'entreprise 14 années auparavant. Le stock de planches a ensuite été renouvelé au fur et à mesure en fonction des besoins, en cas de planches cassées ou fendues par exemple.

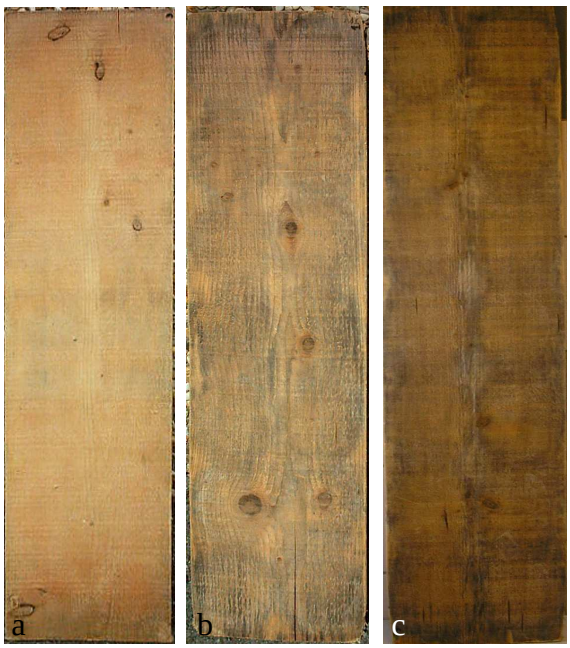


Figure I.11. Planches d'affinage à 3 âges différents : jeune (moins de 4 ans) (a), d'âge moyen (de 4 à 8 ans) (b) et âgée (plus de 8 ans) (c).

Le cycle d'utilisation d'une planche est résumé sur la Figure I.12. Après l'étape de contact avec le fromage de 2 jours dans la cave 1 (1 jour par face) et de 6 à 9 jours dans les caves 2 et 3, la planche est nettoyée à l'aide d'une machine à brosser les planches (Figure I.13) selon un protocole précis. La planche est brossée 3 fois 3 secondes avec l'eau du réseau (température froide, variant légèrement en fonction des saisons). Entre ces 3 passages, un délai d'attente de 15 min est mis à profit pour laisser l'eau imprégner la planche. L'opération de nettoyage dure, donc environ 30 min. La planche est ensuite séchée naturellement la journée et en cellule ventilée la nuit. Ainsi, après le brossage mécanisé, la planche est placée à l'extérieur (Figure I.14) pendant la journée (6 à 8h) si le temps est favorable. Le soir, après une estimation visuelle du séchage, s'il n'est pas satisfaisant, la planche est placée dans une cellule de séchage ventilée la nuit suivante. La cellule fonctionne avec un thermostat : lorsque la température dans la cellule atteint 30°C, les planches sont considérées sèches. Le lendemain, le séchage est à nouveau vérifié visuellement et la planche remise à sécher à l'extérieur en cas de doute. Lorsque le séchage apparaît correct, la planche est généralement rangée sur un rayonnage pour être utilisée dans les 24 h. Les planches considérées sèches ont un taux d'humidité d'environ 20-25%, alors que les planches en fin de cave 3 ont un taux d'humidité compris entre 50 et 65%, ce qui fait une différence de 30 à 40%. Ce nettoyage peu agressif (absence de détergent, basse température) a pour objectif de ne pas éliminer les flores d'affinage présentes sur les planches entre 2 cycles d'affinage. Ainsi, les planches sont au cœur du processus d'affinage mis en place par l'affineur partenaire. D'une part, elles servent à l'ensemencement naturel des fromages et d'autre part, l'affineur exploite les aptitudes des planches à sécher les fromages pour former correctement les croûtes.

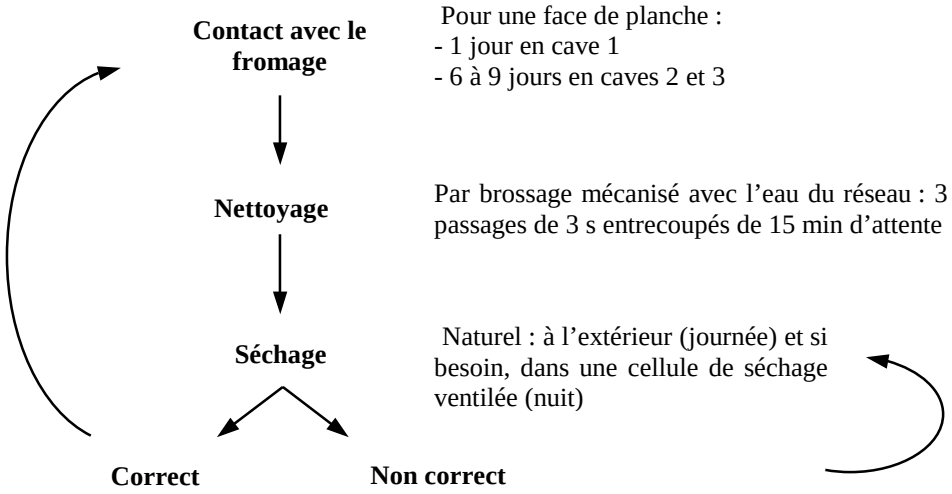


Figure I.12. Cycle d'utilisation d'une planche d'affinage.

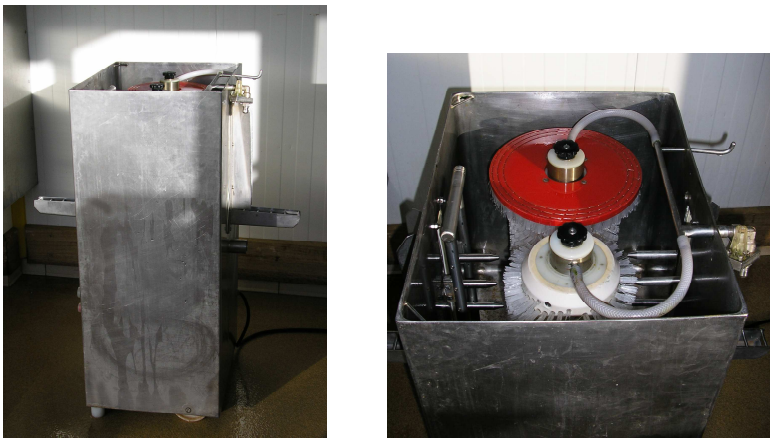


Figure I.13. Machine à brosser les planches

Figure I.14. Séchage des planches en extérieur

Lors de la période estivale, en raison de la chute de production des reblochons, un certain nombre de planches sont stockées dans un local sec, hors des caves. Ceci permet d'ajuster le nombre de planches nécessaires à l'affinage et de ne pas laisser des planches en cave sans fromage. A l'automne, les planches stockées sont réintégrées dans le stock utilisé, sans protocole particulier. Par contre, lors de la mise en service d'une planche neuve, celle-ci est lavée plusieurs fois avant d'être intégrée au stock.

Il est important de noter que les planches une fois sèches peuvent être utilisées pour affiner des fromages dans toutes les caves et donc à tous les stades décrits plus haut. Ce principe de rotation des planches génère un brassage des flores entre les caves d'affinage et entre les planches. En effet, l'objectif de l'affineur est d'obtenir un croutage homogène et régulier sur tous les fromages de toutes les origines. Malgré l'homogénéisation visuelle des croutages, les spécificités des qualités organoleptiques des reblochons (goût et texture de pâte), selon l'origine (producteur

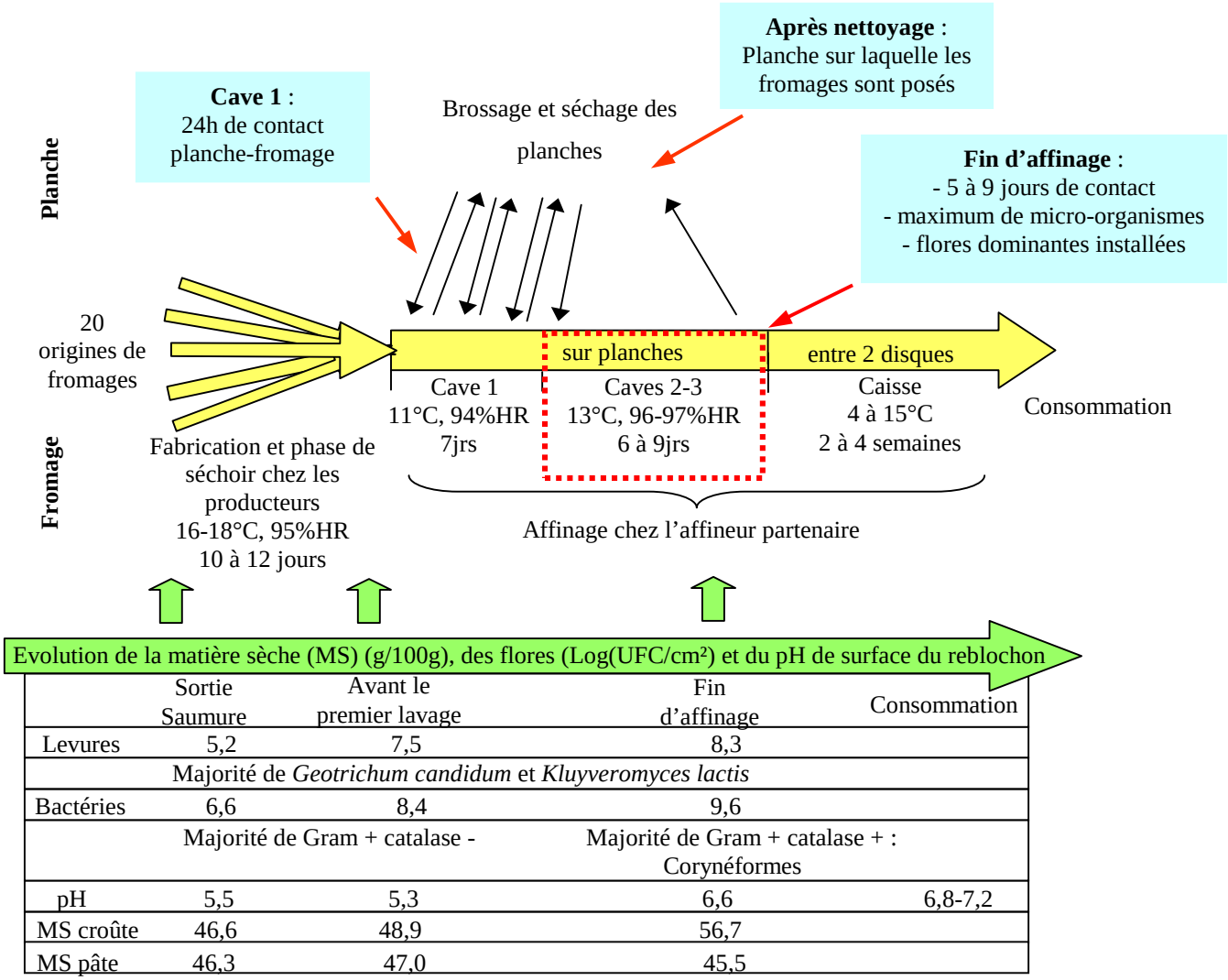
fermier) sont conservées. En effet, les pratiques de traite (lavage du matériel de traite, soins apportés aux mamelles avant et après la traite) influencent le niveau des différentes populations microbiennes du lait, notamment les flores d'intérêt technologique (Michel *et al*., 2001). Ces variations de flores, avec les techniques de fabrication, agissent sur les caractéristiques sensorielles des fromages (Demarigny *et al*., 1997 ; Rehman *et al*., 2000 ; Bockelmann, 2002 ; Leclercq-Perlat *et al*., 2004).

III. Les facteurs potentiels de variation de la composition microbienne du biofilm présent sur les planches d'affinage

La Figure I.15 résume toutes les informations essentielles pour émettre des hypothèses sur les profils microbiens présents sur les planches : gestion des planches, modalités d'affinage des fromages et connaissances de l'évolution des flores de surface des fromages. En effet, la forte correspondance entre les flores de surface des fromages et les flores présentes à la surface des planches a été démontrée par Mounier *et al.* (2006) et l'étude ACTIA n° RA 97.31 (ITFF, 2000). Les hypothèses quant aux profils microbiens des planches sont ici nécessaires pour choisir les stades à étudier au cours du processus d'affinage.

Trois types de populations présentes sur les planches peuvent être distingués :

- la première, en cave 1 ou début d'affinage, correspondrait à un biofilm en contact avec les micro-organismes du fromage : levures et bactéries principalement à Gram positif et catalase négative. La durée de contact d'une planche avec un fromage entre 2 nettoyages est courte (24 h).
- la deuxième, en fin de cave 3 ou fin d'affinage, s'installerait progressivement en caves 2 et 3 (5 à 9 jours de contact avec les mêmes fromages), pour atteindre une population maximum en fin de cave 3 avec une flore levurienne et bactérienne (Gram positif et catalase positive), proche de la surface des fromages.
- la troisième, après nettoyage, correspond au biofilm résiduel sur la planche après la procédure de nettoyage (brossage à l'eau froide et séchage ventilé), celui sur lequel les fromages sont déposés.



	Sortie Saumure	Avant le premier lavage	Fin d'affinage	Consommation
Levures	5,2	7,5	8,3	
	Majorité de *Geotrichum candidum* et *Kluyveromyces lactis*			
Bactéries	6,6	8,4	9,6	
	Majorité de Gram + catalase -		Majorité de Gram + catalase + : Corynéformes	
pH	5,5	5,3	6,6	6,8-7,2
MS croûte	46,6	48,9	56,7	
MS pâte	46,3	47,0	45,5	

Figure I.15. Schéma du processus d'affinage d'un reblochon fermier et cycles d'utilisation des planches chez l'affineur partenaire : détermination des hypothèses pour les profils microbiens présents sur les planches en fonction du stade d'affinage (D'après Etude Smear Cheese Microflora Projet QLK1-CT-2001-02238 « Biodiversity and anti-Listerial activity of surface microbial consortia from Limburger, Reblochon, Livarot, Tilsit ans Gubbeen cheese).

Pour la suite de l'étude, le stade d'affinage analysé correspond à l'affinage des caves 2 et 3, en raison du temps de contact plus important entre le fromage et la planche ainsi que la présence des flores dominantes installées en fin de cave 3. Les 2 stades de prélèvement retenus sont les stades

« fin d’affinage, avant nettoyage» et « fin d’affinage, après nettoyage ». Le premier, qui sera nommé « fin d’affinage » est en effet le plus représentatif de l’écologie microbienne du biofilm présent sur les planches et à la surface des fromages. Le deuxième, nommé « après nettoyage » permettra d’évaluer l’impact du nettoyage. Il correspond aussi au stade où le risque d’introduction des flores pathogènes provenant du lait et des premières étapes de fabrication des fromages est le plus important.

En plus du stade de prélèvement, 2 autres facteurs peuvent faire varier la composition microbienne du biofilm : l’âge des planches en raison de son influence sur le séchage des fromages, et l’origine du fromage affiné sur la planche. En effet, les différences de technologies de fabrication et les caractéristiques des locaux de chaque producteur induisent des compositions physico-chimiques et microbiennes des fromages spécifiques, qui conduisent à des caractères organoleptiques spécifiques des fromages en fonction du producteur (goût et texture).

Chapitre 2 : Dynamique de l'écologie des communautés de micro-organismes des planches en bois au cours de l'affinage des fromages

I. Introduction

Malgré son utilisation quotidienne depuis des décennies pour la production alimentaire, d'un point de vue réglementaire, le bois est autorisé au contact des aliments traditionnels par une dérogation de la commission européenne (décision n° 96/536/CE du 29 juillet 1996). Très peu d'études ont été réalisées sur les interactions entre les micro-organismes et le bois, et le statut hygiénique du bois dans les industries agro-alimentaires. Ces études sont de plus, souvent réalisées dans des conditions expérimentales différentes et contradictoires (Carpentier, 1997).

La première caractérisation microbienne d'un biofilm implanté sur du bois a été réalisée sur des fûts de fermentation de cidre par Swaffield *et al*. (1997). Des bactéries, lactiques et acétiques ainsi que des levures ont été dénombrées et retrouvées jusqu'à une profondeur de 1,2 cm après 2 semaines d'immersion. La stabilité de ce biofilm et son influence sur les profils organoleptiques des cidres ont aussi été démontrées. En technologie fromagère, les écosystèmes microbiens peuvent être étudiés classiquement par dénombrement sur gélose ou, plus récemment, par des techniques biomoléculaires, comme la SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) et la TTGE (Temporal Temperature Gradient Electrophoresis) (Duthoit *et al*., 2003 ; Ogier *et al*., 2004) ou par spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF) (Wenning *et al*., 2006). Les influences de l'origine du lait (vache ou chèvre) (Bockelmann *et al*., 2001), du type de production fromagère (fermière ou industrielle) (Feurer *et al*., 2004) et du potentiel anti-*Listeria* (Maoz *et al*., 2003) sur l'écosystème de surface du fromage ont été étudiées. A notre connaissance, peu d'études ont été publiées sur l'écologie microbienne des planches d'affinage en bois. Une étude a décrit le développement microbien à la surface de gerles en bois utilisées

pour la fabrication du fromage salers par des observations au Microscope Electronique à Balayage (MEB) (Richard, 1997). Pour les planches d'affinage en bois, Mounier *et al*. (2006) et l'étude ACTIA n° RA 97-31 (ITFF, 2000), ont démontré la forte corrélation entre les flores présentes à la surface des fromages et à la surface des planches d'affinage en bois et le potentiel technologique des planches en bois traditionnellement utilisées. L'analyse de l'écosystème microbien présent sur les planches d'affinage en bois est donc une priorité pour évaluer le statut hygiénique du bois en fromagerie.

L'objectif de cette partie est la caractérisation microbiologique et physico-chimique de l'écosystème présent à la surface des planches d'affinage. La première étape a été de décrire le biotope des planches d'affinage en bois du reblochon de Savoie : paramètres physico-chimiques de surface, présence de chlorure de sodium (NaCl) et de matière organique. Ensuite, les consortia de surface des planches ont été dénombrés en fonction des facteurs de variations déterminés au chapitre 1 : âge des planches, origine des fromages et stade de prélèvement. L'objectif était ici d'identifier les sources de variation de la composition microbienne de surface des planches. Enfin, l'influence de biotope des planches sur le développement des micro-organismes a été déterminée.

En raison du peu de travaux publiés sur les planches d'affinage, une première partie a été consacrée aux choix méthodologiques. En effet, l'étude d'un biofilm naturel nécessitait la mise en place de méthodologie limitant au maximum les modifications du biofilm liées au transport des planches, au prélèvement et à la cryoconservation des consortia. Ainsi, une méthode de conditionnement des planches pour le transport des caves d'affinage jusqu'au laboratoire a été choisie. De même, 2 méthodes de décrochage ont été comparées : la méthode impliquant des ultrasons (Oulahal-Lagsir *et al*., 2003) et la méthode par brossage, décrite dans le programme ACTIA n°RA 97-31 (ITFF, 2000). Les ultrasons permettent un décrochage par l'intermédiaire d'un milieu liquide grâce au phénomène de cavitation et permettent de s'affranchir des irrégularités de forme sur la zone d'action localement recouverte du liquide propagateur et récupérateur. Par son principe, cette méthode semble plus appropriée pour le bois. Les chiffonnettes et les écouvillons n'ont pas été retenus en raison de leur moindre efficacité (Cerf et Carpentier, 1992). De même, en l'absence de travaux précédents sur les planches d'affinage une évaluation de la variabilité physico-chimique et microbienne de ce biofilm et de son

environnement a du être réalisée. Ainsi, la variabilité intra-planche des grands groupes microbiens et des paramètres physico-chimiques des planches (pH et activité de l'eau) a été étudiée.

Dans une deuxième partie, le biofilm et son environnement ont été analysés par détermination des courbes de sorption et des paramètres physico-chimiques des planches (humidité, pH, a_w et taux de NaCl) en fonction de l'origine, de l'âge de la planche et du stade de prélèvement. Les paramètres physico-chimiques peuvent en effet influencer la croissance des micro-organismes. En complément, une composition biochimique partielle d'une suspension de décrochage d'un biofilm a été réalisée. Des analyses par spectroscopie IRTF (Infra-Rouge à Transformée de Fourier) d'échantillons de planches d'affinage ont permis de caractériser certains composants moléculaires du biofilm directement à la surface des échantillons, sans prélèvement.

Enfin, dans une troisième partie, la description microbiologique du biofilm présent sur les planches d'affinage a été réalisée par dénombrement des groupes microbiens sur géloses sélectives en fonction de l'âge de la planche, de l'origine des fromages posés sur la planche et du stade de prélèvement. La technique SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) a aussi été employée en parallèle de certains dénombrements pour mettre en évidence des microflores présentes sur les planches mais non cultivables ou non sélectionnées avec les géloses. Des observations morphologiques des différents biofilms au Microscope Electronique à Balayage et par Imagerie Spectrale Confocale ont été réalisées afin de déterminer la disposition et la répartition des micro-organismes au sein du biofilm sur le support bois.

II. Matériel et méthodes

1. Modalité d'affinage du reblochon chez l'affineur partenaire et choix des caractéristiques des planches à étudier

Comme décrit dans le chapitre 1, le Reblochon de Savoie est un fromage au lait cru entier, à pâte légèrement pressée, non cuite et à croûte mixte. Chez l'affineur partenaire, les fromages provenant de 20 producteurs différents, sont affinés sur des planches en bois pendant environ 15 jours, avant d'être conservés dans des caisses en bois. L'affinage sur planches se décompose en 2

étapes qui se déroulent dans 3 caves différentes. Dans la première cave (11°C et 95% HR), les fromages sont lavés une fois, retournés quotidiennement et les planches changées tous les 2 jours. Dans les caves 2-3 (13°C et 95% HR), les fromages sont affinés pendant 5 à 9 jours et les planches ne sont plus changées et restent en contact avec les mêmes fromages, sans lavage. Les planches analysées dans notre étude étaient choisies en cave 2-3.

Les planches utilisées pour l'affinage sont en épicéa (*Picea abies*) et sont coupées dans le sens longitudinal, sans rabotage. Les planches analysées dans cette étude étaient âgées de 6 mois à 14 ans, ce qui correspond à leur durée d'utilisation en affinage. Chaque planche a 14 empreintes sur chaque face, qui correspondent aux zones de contact avec les fromages. Après l'affinage d'un lot de fromage, chaque planche est brossée mécaniquement avec l'eau froide puis séchée à l'air ventilé. Les planches sont ensuite prises au hasard pour l'affinage d'un nouveau lot de fromages.

L'étude du processus d'affinage a mis en évidence plusieurs facteurs potentiels de variation de la composition du biofilm présent sur les planches d'affinage (cf. Figure I.15) : le stade de prélèvement, l'âge des planches et l'origine des fromages affinés sur les planches. Les deux stades de prélèvement retenus pour la suite de l'étude sont les stades « fin d'affinage » et « après nettoyage ». Trois catégories d'âges ont choisies en fonction des observations de l'affineur : jeune (moins de 4 ans), d'âge moyen (4 à 8 ans) et âgée (plus de 8 ans). Huit origines (A à H) ont été retenues présentant des qualités organoleptiques des fromages différentes (goût et texture).

2. Transport des planches d'affinage étudiées

Pour la grande majorité des analyses effectuées sur les planches, celles-ci étaient transportées des caves d'affinage jusqu'aux laboratoires. En fonction des possibilités techniques, les conditions du mode de transport pouvaient varier sauf pour un point : la planche à analyser était placée entre 2 planches issues de la même cave et donc à la même humidité, de manière à éviter des variations d'humidité, qui pourraient modifier la composition microbienne du biofilm. Dans un premier temps, l'influence de la présence de 2 couches de film alimentaire autour de la planche à analyser a été évaluée. Au cours des 3 années de ce programme, deux facteurs n'ont pas pu être répétés à l'identique pour chaque étude. Premièrement, le transport des planches a pu varier en durée, de 1 à 2 heures en cas d'analyse à Léamil (La Roche sur Foron) et au LRGIA (Bourg en

Bresse), jusqu'à 24 h en cas d'envoi d'échantillons à Massy. Deuxièmement, la maîtrise des conditions de transport a aussi varié, de l'absence de maîtrise, lors d'envoi d'échantillon (température ambiante et emballage de film alimentaire) jusqu'à l'utilisation dans un caisson en polystyrène expansé (Figure II.1) pour limiter les variations de température et d'humidité. Ces 2 facteurs peuvent modifier la composition microbienne du biofilm. Les conditions de transport ont été détaillées pour chaque étude dans la section facteurs étudiés.

Figure II.1 Caisson de transport avec 2 planches emballées individuellement avec 2 couches de film alimentaire et placées entre 2 autres planches, à la même humidité

3. Méthodologie de prélèvement du biofilm

3.1 Par la technique des ultrasons

Le décrochage par ultrasons a été réalisé avec un générateur d'ultrasons (40kHz) (Branson Ultrasonics, Rungis, France) connecté à une sonotrode portable d'un diamètre de 15 mm et une chambre de prélèvement en acier inoxydable. Les ultrasons étaient délivrés pendant 10s dans la chambre de prélèvement, préalablement remplie avec 15 mL de Ringer (solution au 1/4) stérile (Biokar, Beauvais , France), directement sur 10 cm² de planche, selon le protocole décrit par Oulahal-Lagsir *et al.*, (2003). Un joint en latex assurait l'étanchéité de la chambre en acier inoxydable. La suspension de décrochage était ensuite homogénéisée à l'aide d'une pipette et

placée dans un flacon stérile. Elle constituait la solution mère (10^0) pour les dénombrements microbiologiques. Le protocole précis est détaillé dans l'annexe 2.

3.2 Par la technique de brossage

Pour le décrochage par brossage, une surface de 10 cm² (4 × 2,5 cm) d'une empreinte de la planche d'affinage était délimitée avec un ruban adhésif puis celui-ci désinfecté à l'alcool (70°). Après le dépôt d'un diluant (Ringer, solution au ¼) contenant du Tween 80 (2 g/L) (Merck, Lyon, France) et de l'Agar (3 g/L) (Biokar, Beauvais, France), la surface était ensuite brossée à l'aide d'une brosse à dent, préalablement stérilisée, de la marque Bioseptyl-médium 10 fois horizontalement et 10 fois verticalement. Le diluant contenant les micro-organismes décrochés était épongé et récupéré à l'aide de chiffonnettes stériles (3 × 3 cm, Super Twill bleues), qui étaient ensuite placées dans un sac Stomacher contenant 30 ml de Ringer au ¼. Après un passage au Stomacher, la suspension de décrochage était placée dans un flacon stérile et constituait la solution mère (10^0) pour les dénombrements microbiologiques. Le protocole précis est détaillé dans l'annexe 2.

4. Détermination des niveaux de populations microbiennes

4.1 Cryoconservation des échantillons

Pour des raisons pratiques, certains dénombrements n'ont pas pu être effectués le même jour que le transport des planches, les analyses physico-chimiques et le décrochage. Dans ce cas, la cryoconservation a permis de différer les analyses microbiologiques. La suspension de décrochage était mélangée (volume/volume) avec une solution de lait stérile (110 g/L, Prolait, Eurial Poitouraine, Jaunay Clan, France), supplémentée avec 15% de glycérol (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), avant une congélation à –80°C selon le protocole décrit par Chamba *et al*. (2005). Les échantillons n'ont pas été conservés plus de 6 mois à -80°C, et ils ont tous été décongelés pendant 20 min à température ambiante.

4.2 Dénombrement de la population cultivable sur milieux gélosés

Les dénombrements ont été effectués directement sur les suspensions de décrochage ou après cryoconservation. Les flores dénombrées ont été choisies en raison de leur rôle dans l'affinage des reblochons et des interactions déjà décrites dans la littérature avec *Listeria monocytogenes*. Les dénombrements ont été effectués en double, en surface, à l'aide d'un ensemenceur spiral (Interscience, Saint Nom La Bretèche, France). Les différents milieux ainsi que les conditions d'incubation sont résumés dans le Tableau II.1.

Tableau II.1 Conditions de dénombrement des flores des suspensions de décrochage.

Flores théoriques recherchées	Normes ou Références	Milieu gélosé	Conditions d'incubation		
			Durée (jrs)	Temp. (°C)	An[a]/Ae[b]
Flore Mésophile Aérobie Revivifiable		PCA	7	20	Ae
Microcoques et Corynébactéries	ITFF-AERIAL	MCM[c] + F[d] + N[e]+ A[f]	5	20	Ae
Flore halophile		Chapman	2	37	Ae
Levures et Moisissures		CGA	5	20	Ae
Leuconostocs	FIL180A:1997	NL + V[g]+ A[f]	5	20	Ae
Flore acidifiante mésophile	Chamba et al., 1981	Mésophile Elliker[h]	5	15	Ae
Lactobacilles Heterofermentaires Facultatifs	Isolini, 1990	FH + V[i]	3	37	An
Entérocoques		BEA	2	37	Ae
Staphylococcus spp	Denis, 2001	CRBM + B[j] + N[e] + A[f]	5	20	An
Staphylocoques à coagulase +	NF V08-057-2, 2004	Baird Parker	2	37	Ae
Pseudomonas spp		GSP + P[k]+ A[f]	3	20	Ae
Coliformes	NF V08050, 1999	VRBL	1	30	Ae

[a]An : anaérobie.
[b]Ae : aérobie.
[c]MCM : 15 g de tryptone (Difco), 5 g de peptone de soja (Difco), 6 g d'extrait de levure (Difco), 20 ml de lactate de sodium (solution à 60%) (Merck), 2,5 g de phosphate de dipotassium (Merck), 40 g de chlorure de sodium (Cooper), 15 g d'agar bactériologique (Biokar) dans 1L d'eau distillée.
[d]F : Furazolidone (10 mg/L).
[e]N: Acide Nalidixique (40 mg/L).
[f]A: Amphotéricine B (80 mg/L).
[h]Mesophile Elliker : 20 g de tryptone (Difco), 5 g d'extrait de levure (Difco), , 2,5 g de gélatine (Merck), 4 g de chlorure de sodium (Cooper), 1,5 g d'acétate de sodium anhydre (Humeau), 0,5 g d'acide ascorbique (Fischer), 10 g de lactose (Merck), 0,5 g de glucose (Merck), 5 g de glycérophosphate de sodium (Humeau), 15 g d'agar bactériologique (Biokar) dans 1L d'eau distillée, avec un pH ajusté à 7.
[g,i]V: vancomycine ([g]170 mg/L et [i]50 mg/L).
[j]B : Bacitracine (30 mg/L).
[k]P : Pénicilline G (57,8 mg/L).

Tous les milieux sélectifs commercialisés proviennent de Biokar (Beauvais, France), sauf les géloses GSP (Merck, Lyon, France) et Baird Parker (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France). Tous les antibiotiques ont été fournis par Sigma (Saint Quentin Fallavier, France), sauf l'amphotéricine B et la pénicilline G qui proviennent de Calbiochem (Fontenay-sous-Bois, France). La composition ainsi que la sélectivité des milieux et de dénombrement sont détaillées en annexe 3. Pour les entérocoques et les staphylocoques spp, les colonies dénombrées n'ont pas été identifiées.

4.3 Analyse des consortia par la technique SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

Ces analyses ont été réalisées par MC. Montel dans l'unité INRA de « Recherches Fromagères » d'Aurillac. Après décongélation des cryotubes, l'ADN total des échantillons a été extrait selon la méthode phénol/chloroforme sur 2 fois 250 µl selon Duthoit *et al*. (2003). Les 2 culots ont été repris dans 25 µl d'eau puis regroupés. 3 régions des génomes ont ensuite été amplifiées par PCR : V2, V3 de l'ADNr 16S des bactéries avec les amorces V2F et V2R, et W34 et W49, respectivement (Duthoit *et al*., 2003) ainsi que la région V4 de l'ADNr 18s des levures avec les amorces Lev1-lev2 (Callon *et al*., 2006). Un aliquot des produits des PCR a été mélangé avec du formamide desionisé (Applied Biosystems), dénaturé à 95°C pendant 3 min, puis refroidi dans de la glace. Les fragments d'ADN ont adopté une structure secondaire dépendante uniquement de la séquence du fragment. Les différents fragments ont ensuite migré par électrophorèse SSCP (ABI Prism 310 genetic analyser, Applied Biosystems), en fonction de leur conformation. Les différentes conditions de l'électrophorèse étaient : un temps d'injection de 5s, un voltage d'injection de 15kV, un voltage de migration de 12kV, un temps de collecte de 30 min à une température constante de 32°C (Duthoit *et al*., 2003). Le logiciel GeneScan Analysis software (Applied Biosystems) a analysé le signal : le temps d'élution était exprimé en scans (unité du logiciel), la hauteur et l'aire des pics étaient déterminées en fonction de l'intensité de la fluorescence de l'ADN.

5. Observation microscopique des planches d'affinage

Ces observations ont été réalisées par R. Briandet et F. Dubois-Brissonnet à Massy dans l'unité UBHM par les 2 techniques suivantes : Imagerie spectrale confocale, ou microscopie confocale à balayage laser et microscopie électronique à balayage.

5.1 Imagerie spectrale confocale

Un microscope laser confocal à balayage (Leica, SP2 ADBS) a été utilisé pour obtenir des images du biofilm présent sur des échantillons de planches en bois. Pour observer les biofilms, quelques gouttes d'un marqueur d'acides nucléiques (SYTO ou Orange acridine) ont été déposées sur les planches.

5.2 Microscopie électronique à Balayage

Les échantillons des planches à observer ont été fixés dans une solution de glutaraldéhyde à 3 % (v/v) pendant 1 heure, puis rincés 3 fois pendant 10 min dans une solution de cacodylate de sodium (0,2 M, pH = 7,4). Ils ont été ensuite déshydratés dans 3 bains d'éthanol (70, 95 et 100%, v/v) (10 min par bain). Enfin, ils ont été recouverts d'or par évaporation cathodique sous vide (Jeol JFC 1102, Tokyo, Japan). Les observations des échantillons ont ensuite été réalisées à l'aide d'un microscope électronique à balayage (Hitachi S-4500, Ibaraki, Japon), à un voltage de 10kV.

6. Caractérisation physico-chimique des planches d'affinage

Les principaux paramètres influençant le développement microbien ont été analysés pour caractériser l'environnement physico-chimique de la surface des planches : le pH, l'a_w, le taux de NaCl, le taux d'humidité. Les principes et les modes opératoires pour les mesures de l'a_w, du taux de NaCl et du taux d'humidité sont détaillés dans l'annexe 4.

6.1 Mesure du pH de surface

Pour analyser le pH à la surface des planches d'affinage, au LRGIA ou à Léamil, du papier pH et une électrode de surface ont été utilisées au cour de cette étude. Pour la technique du papier pH, une goutte d'eau distillée était déposée sur la surface d'une empreinte. Après 10 min à 15°C, le papier pH (Neutralit pH5-10, Merck, Lyon, France) était placé dans l'eau et, en fonction de la couleur observée, le pH déterminé. La sensibilité de cette méthode a été évaluée à 0,5 unit pH. Pour l'électrode de surface, 1 min après le dépôt de 100 µl d'eau distillée sur une empreinte, le pH était déterminé à 15°C avec l'électrode (Crison, Allela, Espagne). Pour cette méthode, la sensibilité de la mesure était évaluée à 0,1 unité pH.

6.2 Mesure de l'a_w

L'a_w était déterminée au LRGIA avec un appareil à point de rosée (FA-st/1, GBX Scientific Instruments, Romans sur Isère, France). La chambre de mesure était déportée sur la planche, pour permettre une mesure non destructive. La sensibilité de la mesure était de 0,005. Chaque valeur obtenue correspond à une moyenne de 3 mesures.

6.3 Détermination de la teneur en chlorure de sodium

Une méthode a été mise au point à l'ITFF, au Laboratoire d'Analyse Alimentaires et de Recherche Fromagère (LARF), à Mamirolles. Pour obtenir la valeur du taux de NaCl à la surface des planches, 27,5 cm² de la surface d'une empreinte ont été poncés sur environ 1 mm d'épaisseur. Un gramme de sciure était ensuite mélangé à l'ultraturax avec 50 mL d'eau distillée puis décantée à température ambiante pendant 1 heure. La concentration des ions chlorures était ensuite déterminée avec un chloruremètre (Corning International, USA) selon la méthode de référence utilisée pour les produits alimentaires. La sensibilité de cette technique a été calculée à 0,06 mg/cm².

6.4 Détermination du taux d'humidité

Pour mesurer le taux d'humidité des planches en cave d'affinage puis au laboratoire, deux planches au même stade étaient superposées sur une structure non métallique, puis un humidimètre électronique DS4A-DOMA (Scangaule, Gravigny, France) était déposé sur la surface de la planche du dessus et la teneur en eau affichée, exprimée en % (m/m). Cette valeur correspond au taux d'humidité moyen, qui dépend de la densité et de la rugosité de la surface. La sensibilité de cette mesure a été calculée à 10% d'humidité.

Pour obtenir les courbes de sorption, qui correspondent aux isothermes de sorption du matériau en fonction de l'humidité de l'air ambiant, les planches ont été sciées en échantillons de 12 x 30 cm. Pour la courbe de désorption, ces échantillons ont été placés dans une étuve à 14°C avec des humidités successives de 95, 90, 79, 70, 49 et 27% d'humidité (±5%). Pour chacun de ces points, chaque échantillon de planche a été pesé après stabilisation de son humidité (moins de 0,5% en 24h selon la norme NFB 51003). Pour la courbe d'absorption, les échantillons ont été placés aux mêmes taux d'humidité mais dans l'ordre croissant. Les courbes de sorption ont été réalisées par H. Callot au Centre Technique du Bois et de l'Ameublement (CTBA), à Bordeaux.

7. Analyse des constituants biochimiques du biofilm

7.1 Analyse de la suspension de décrochage

Les analyses biochimiques ont été effectuées sur une suspension de décrochage par brossage de 60 cm² dans 60 ml de Ringer au LARF à Mamirolles.

Les teneurs en lactates (L et D) ont été déterminées dans la solution par dosage enzymatique avec le kit D-Lactic acid/ L- Lactic acid (Boehringer, Reims, France).

Les teneurs en lactose et en galactose ont été déterminées par dosage enzymatique avec le kit Boehringer Lactose /D-galactose (Boehringer, Reims, France).

La teneur en matières grasses a été déterminée selon la norme NF ISO 1735 (anonyme, 2004a). Cette méthode est connue sous le nom de SBR "Schmid - Bondzynski - Ratzlaff". La suspension

(10 ml) est additionnée e 10 ml d'acide chlorhydrique (675ml d'une solution à 36% (v/v) dans 1 litre pour une densité finale de 1,125) à 100°C, puis de 10 ml d'éthanol (98%) est ajouté. Une extraction de cette solution éthanolique acide par une solution à volume égal d'éther diéthylique et d'éther de pétrole est ensuite réalisée. Après élimination des solvants par évaporation (50°C), la masse des substances extraites solubles dans l'éther de pétrole est déterminée.

La détermination de l'Azote Total par la méthode Kjedahl a été réalisée selon la norme NF ISO 8968-1 (anonyme, 2002c). La première étape consiste en une digestion de la suspension (1,5 ml) avec 10 ml d'acide sulfurique (98%, m/m) à 420°C, durant laquelle l'azote ou les protéines contenues dans l'échantillon se transforment en sulfate d'ammonium. Puis, après alcalinisation par ajout de 30ml de soude (30%, m/m) l'ammoniac formé est entraîné par distillation, et dosé pour obtenir la teneur en azote total de l'échantillon, grâce à l'appareil automatique de distillation à vapeur et dosage « Kjeltec 2460 » (FOSS, Nanterre, France)

7.2 Spectroscopie infra rouge

Trois analyses différentes ont été effectuées par spectroscopie Infra-Rouge à Tranformée de Fourrier (IRTF) au LRGIA par A. Carnet : des morceaux de planches sciées, des lames avec 6 ml de plusieurs suspensions de décrochage par brossage (10 cm² dans 30 ml de Ringer) déposés puis séchés sous une hotte à flux laminaire et une croûte de reblochon au stade « fin d'affinage ».

Afin d'obtenir des spectres IRTF-ATR (Attenuated Total Reflectance), des planches, des lames et de la croûte de reblochon ont été directement déposés sur le cristal ZnSe ATR. Les spectres ont été enregistrés avec un spectromètre FTIR BOMEM FTLA 200-100, entre 800 et 4000 cm^{-1}, avec une résolution de 8 cm^{-1}, et une accumulation de 20 scans. Dans ces conditions, 40s étaient nécessaires pour obtenir un spectre. Les spectres ont ensuite été pré-traités par I. Adt à l'aide du logiciel Opus NT 3.1 (Brucker optics, Wissembourg, France) avec une normalisation vectorielle sur toute la surface, ce qui permet une analyse à la fois qualitative et quantitative, et une correction de la ligne de base (Adt *et al*., 2006)).

8. Analyse Statistique

Les dénombrements sont exprimés en Log(UFC/cm²) et le taux des NaCl en mg/cm². Pour évaluer l'influence des différents facteurs, des analyses de variance ont été réalisées avec le logiciel "Splus 2000" (Mathsoft, Seattle, USA). Les principaux effets et les interactions ont été estimés avec une analyse de variance ANOVA (de type III en cas de groupes déséquilibrés), et des comparaisons de moyenne (test de Bonferoni, avec un niveau significatif de $P < 0,05$). Lorsqu'un seul facteur était étudié, les écart-types ont été utilisés pour différencier les groupes.

III. Résultats - Discussion

1. Choix méthodologiques, étude de la variabilité des paramètres physico-chimiques des planches et des consortia présents sur les planches

1.1 Choix de la méthode de prélèvement des biofilms présents sur les planches d'affinage

Le choix de la méthode de prélèvement d'un consortium d'une planche en bois sans influence sur la cultivabilité des flores de ce consortium est un pré-requis indispensable pour la suite de l'étude. Deux méthodes de prélèvement ont donc été comparées : par prélèvement ultrasonique ou par brossage.

Cette comparaison des méthodes de prélèvement du biofilm a été réalisée sur 6 planches, 4 au stade fin d'affinage et 2 au stade après nettoyage. Les 6 planches utilisées pour l'affinage de fromages de 6 origines différentes (A, C, D, E, I, L) étaient toutes d'âge moyen (entre 4 et 8 ans). Les 6 planches ont été collectées au cours de 2 saisons : printemps et automne. Les analyses se sont déroulées le lendemain de la collecte des planches chez l'affineur après un stockage à température ambiante. Pour chaque planche, 5 empreintes ont été prélevées avec les 2 méthodes, ultrasons et brossage, pour un total de 40 suspensions de décrochage pour le stade fin d'affinage et 20 pour le stade après nettoyage.

Le Tableau II.2 compare l'influence des 2 techniques de prélèvement pour le stade fin d'affinage, sur les dénombrements de la Flore Mésophile Aérobie Revivifiable (FMAR), les levures et moisissures, et la flore halophile.

Tableau II.2. Comparaison des dénombrements (Flore Mésophile Aérobie Revivifiable (FMAR), levures et moisissures, et flore halophile) obtenus avec les 2 méthodes de décrochage sur des planches au stade fin d'affinage (Log(UFC/cm²)).

Facteurs	FMAR (n=40)	Levures-Moisissures (n=40)	Flore halophile (n=40)
Moyenne ± et[1]	7,95 ± 0,037	6,01 ± 0,043	5,11 ± 0,090
Planche	***[2]	*[3]	***[2]
1 (n=10)	7,99 ± 0,075[b]	5,89 ± 0,087[a]	5,05 ± 0,181[a]
2 (n=10)	8,32 ± 0,075[c]	6,26 ± 0,087[b]	5,42 ± 0,181[b]
3 (n=10)	7,86 ± 0,075[ab]	5,95 ± 0,087[ab]	5,14 ± 0,181[ab]
4 (n=10)	7,65 ± 0,075[a]	5,92 ± 0,087[a]	4,47 ± 0,181[a]
Décrochage	***[2]	**[4]	NS[5]
Ultrasons (n=20)	7,75 ± 0,053[a]	6,15 ± 0,061[b]	5,22 ± 0,128
Brossage (n=20)	8,16 ± 0,053[b]	5,86 ± 0,061[a]	5,01 ± 0,128
Planche x Décrochage	NS[5]	NS[5]	*[3]

[1] et : erreur type

[2] P < 0,001

[3] P < 0,05

[4] P < 0,01

[5] NS : Non significatif

Les faibles dénombrements des coliformes prélevés sur les planches (11 échantillons sur 20 à moins de 2,48 Log(UFC/cm²) pour les planches 1 et 2, et 16 échantillons sur 20 à moins de 0,48 Log(UFC/cm²) pour les planches 3 et 4), n'ont pas permis une analyse statistique. Malgré, des différences statistiquement significatives, entre les décrochages par ultrasons et brossage pour la FMAR, et les levures et moisissures, ces 2 techniques apparaissent équivalentes au vu du faible écart entre les moyennes ultrasons et brossage (0,4 Log(UFC/cm²) pour la FMAR et 0,3 Log(UFC/cm²) pour les levures et moisissures). Pour la flore halophile, il n'y a pas de différence

statistiquement significative entre les ultrasons et le brossage pour chacune des quatre planches analysées.

Le Tableau II.3 compare l'influence des 2 techniques de prélèvements pour le stade après nettoyage. Tout comme pour le stade fin d'affinage, malgré des différences statistiquement significatives pour la FMAR et les *Pseudomonas* spp, les 2 techniques de décrochage semblent équivalentes car les écarts de moyenne sont de 0,2 et 0,4 Log(UFC/cm²) pour la FMAR et les *Pseudomonas* spp. Pour les levures et moisissures et la flore halophile, aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence entre le brossage et les ultrasons.

Tableau II.3. Comparaison des dénombrements (FMAR, levures et moisissures, et flore halophile) obtenus avec les 2 méthodes de décrochage, sur des planches au stade après nettoyage (Log(UFC/cm²)).

Facteurs	FMAR (n=20)	Levures-Moisissures (n=20)	Flore halophile (n=20)	*Pseudomonas* spp (n=20)
Moyenne ± et[1]	7,10 ± 0,041	3,31 ± 0,115	3,34 ± 0,105	1,27 ± 0,061
Planche	*[2]	NS[3]	NS[3]	NS[3]
5 (n=10)	7,19 ± 0,058[b]	3,47 ± 0,162	3,24 ± 0,149	1,17 ± 0,086
6 (n=10)	8,01 ± 0,058[a]	3,15 ± 0,162	3,45 ± 0,149	1,37 ± 0,086
Décrochage	*[2]	NS[3]	NS[3]	**[5]
Ultrasons (n=10)	6,99 ± 0,058[a]	3,34 ± 0,162	3,21 ± 0,149	1,08 ± 0,086[a]
Brossage (n=10)	7,21 ± 0,058[b]	3,27 ± 0,162	3,48 ± 0,149	1,45 ± 0,086[b]
Planche x Décrochage	**[4]	NS[3]	NS[3]	*[2]

[1] et : erreur type

[2] P < 0,05

[3] NS : Non significatif

[4] P < 0,01

En l'absence de différence significative d'efficacité de décrochage de la flore microbienne entre les 2 méthodes, la méthode des ultrasons a été retenue pour le reste de l'étude en raison du gain de temps qu'elle procure par rapport au brossage. De plus, la méthode ultrasonique a été démontrée plus reproductible que des méthodes comme les chiffonnettes ou les boites contacts.

En effet, la vitesse de passage des chiffonnettes et la pression exercée sur la surface à analyser sont dépendantes de l'opérateur pour ces 2 méthodes (Bloomfield *et al*., 1994). La méthode par brossage s'apparente dans cette comparaison à la technique des chiffonnettes. La méthode ultrasonique présente aussi l'avantage d'être utilisable en atelier fromager. Cependant, en raison de l'écart faible mais néanmoins répétable pour la FMAR entre les ultrasons et le brossage, qui peut correspondre à une sensibilité d'une ou de plusieurs flores minoritaires aux ultrasons, la méthode par brossage est choisie en cas de cryoconservation ou d'identification des flores présentes sur les planches d'affinage.

1.2 Choix méthodologique du mode de conditionnement pour le transport des planches

Le choix d'une méthode de conditionnement pour le transport des planches, sans influence sur les flores du consortium ou les paramètres physico-chimiques des planches, est un facteur important de la représentativité de nos analyses au laboratoire, par rapport aux caves d'affinage.

La comparaison des 2 modes de conditionnement a été réalisée sur 1 planche d'âge moyen (4 à 8 ans) au stade fin d'affinage, collectée au printemps. Les 2 modes de conditionnement consistaient à placer la planche destinée à l'analyse, avec ou sans emballage en film alimentaire, entre 2 planches non emballées, à la même humidité. Ces 2 planches protectrices servaient de réserve d'humidité autour de la planche destinée à l'analyse. Les analyses ont été effectuées le lendemain de la collecte des planches, avec un stockage à 10°C. Pour chaque empreinte, 2 décrochages ont été effectués chez l'affineur et au laboratoire. Trois empreintes ont été échantillonnées pour chaque mode de conditionnement sur la planche analysée, soit un total de 6 empreintes et 12 suspensions de décrochage.

Le Tableau II.4 compare l'influence du mode de conditionnement des planches entre les caves d'affinage et le laboratoire, pour la FMAR, les levures et moisissures, la flore halophile et les coliformes. Pour ces 4 flores, aucune différence entre les 2 modes de conditionnement n'a pu être mise en évidence pour une durée de transport de 24 h à température ambiante. Par contre, pour les 2 conditionnements, après un transport de plus de 24 h à température ambiante, les dénombrements des levures et moisissures et de la flore halophile diminuent respectivement de 0,3 et 0,5 Log(UFC/cm²). Le transport en planche avec le film alimentaire a été choisi car les

diminutions des populations des levures et moisissures et de la flore halophile étaient légèrement moins importantes (différence non significative, résultats non montrés).

Tableau II.4. Comparaison des dénombrements (FMAR, levures et moisissures, flore halophile et coliformes) en fonction du conditionnement et avant/après le transport (24 h à température ambiante) (Log(UFC/cm²)).

Facteurs	FMAR (n=12)	Levures-Moisissures (n=12)	Flore halophile (n=12)	Coliformes (n=12)
Moyenne ± et[1]	7,42 ± 0,102	5,92 ± 0,041	4,64 ± 0,098	1,13 ± 0,199
Conditionnement	NS[2]	NS[2]	NS[2]	NS[2]
Entre 2 planches (n=6)	7,58 ± 0,144	5,96 ± 0,059	4,60 ± 0,139	0,96 ± 0,281
Entre 2 planches + film alimentaire (n=6)	7,27 ± 0,144	5,88 ± 0,059	4,68 ± 0,139	1,31 ± 0,281
Transport	NS[2]	**[3]	*[4]	NS[2]
Avant (n=3)	7,32 ± 0,144	6,08 ± 0,059[b]	4,91 ± 0,149[b]	1,15 ± 0,281
Après (n=3)	7,52 ± 0,144	5,75 ± 0,059[a]	4,37 ± 0,139[a]	1,12 ± 0,281
Transport x Décrochage	NS[2]	NS[2]	NS[2]	NS[2]

[1] et : erreur type

[2] NS : Non significatif

[3] P < 0,01

[4] P < 0,05

Une fois le mode de conditionnement choisi, l'influence du transport sur l'humidité des planches a été évaluée sur 16 planches de stade fin d'affinage (avant nettoyage) et 12 planches après nettoyage, d'âges variables et sur lesquelles avaient été affinés des fromages d'origines différentes. La collecte de ces planches a été réalisée au printemps et à l'automne. Les humidités de ces planches ont été mesurées avant transport en cave et au laboratoire après un transport de 2 h, entre 2 planches à la même humidité avec du film alimentaire dans un caisson isotherme. Ces humidités ont été mesurées au centre de la planche avec l'humidimètre. Les humidités moyennes mesurées en cave et au laboratoire sont reportées dans le Tableau II.5. Les différences entre les moyennes d'humidité avant et après transport sont de 1% pour le stade fin d'affinage et de 2,7% pour le stade après nettoyage. Elles sont inférieures à la précision estimée de la méthode (10%). Dans nos conditions expérimentales, le transport n'influence pas significativement l'humidité

des planches. La comparaison des écart-types entres les 2 stades indique une plus grande variabilité de l'humidité des planches au stade fin d'affinage (avant nettoyage).

Tableau II.5. Comparaison des humidités mesurées à la température ambiante avant transport en caves d'affinage et après transport en laboratoire sur des planches prélevées à 2 stades de prélèvement. Transport de 2 h dans un caisson isotherme entre 2 planches à la même humidité avec du film alimentaire.

moyenne ; écart-type (%, m/m)	Stade de prélèvement	
	fin d'affinage (n=16)	après nettoyage (n=12)
caves d'affinage	46,8 ; 13,9	30,2 ; 4,2
laboratoire	47,8 ; 14,4	32,9 ; 6,2

Le mode de conditionnement choisi (planche à analyser emballée dans du film alimentaire et placée entre 2 planches à la même humidité et non emballées) n'a pas d'influence sur les grands groupes microbiens du consortium présent sur la planche, ni sur l'humidité de la planche, dans les conditions de transport décrites.

1.3 Etude de la variabilité des valeurs physico-chimiques

Une fois les choix méthodologiques effectués et la représentativité des analyses en laboratoire vérifiées par rapport aux caves, la variabilité des paramètres physico-chimiques sur une empreinte et sur une planche doivent être évaluées afin de connaître le nombre de répétitions à réaliser.

1.3-1 Variabilité intra-empreinte

Pour la variabilité intra-empreinte du pH, 5 répétitions de mesure par électrode ont été effectuées sur 5 empreintes issues de 5 planches avec 1 origine de fromage (C) et de stade et d'âge variables. Le Tableau II.6 résume les moyennes, écart-types et coefficients de variation de ces

mesures de pH. Les coefficient de variation étaient répartis de 0,1 à 5,5%, avec une moyenne de 2,7% ce qui signifie une relative homogénéité des valeurs de pH par empreinte. La variabilité intra-empreinte du pH est donc négligeable.

Tableau II.6. Coefficients de variation des valeurs de pH mesurées sur 5 planches de fin de cave 3 (1 empreinte mesurée par planche).

Empreinte	Moyenne (n=5)	Ecart-type (n=5)	Coefficient de variation
1	7,2	0,27	3,7%
2	7,1	0,22	3,1%
3	6,9	0,01	0,1%
4	7,2	0,40	5,5%
5	6,9	0,05	0,7%
Moyenne	7,1	0,19	2,7%

1.3-2 Variabilité intra-planche

L'étude de la variabilité des paramètres physicochimiques entre empreintes présentes sur une même planche a été réalisée 24h après la collecte des planches en caves, sur 4 planches de fin d'affinage, d'âge variable et après l'affinage de fromages d'origines différentes. La collecte de ces planches a été réalisée pendant l'automne. Deux planches ont été utilisées pour l'a_w et 2 planches pour le pH (mesure par papier pH). Pour chaque planche, 3 répétitions des mesures d'a_w ou de pH étaient effectuées sur 5 empreintes. Le Tableau II.7 compare les différentes valeurs de pH et d'a_w sur des planches d'affinage de fin d'affinage en fonction de l'empreinte. Pour les valeurs d'a_w, malgré l'influence de l'empreinte statistiquement significative, les plus grandes différences observées entre empreintes sont de 0,005 pour les 2 planches, ce qui correspond au seuil de précision donné par l'appareil. La variabilité intra-planche de l'a_w est donc négligeable. Pour les valeurs de pH, aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence en fonction de l'empreinte pour 2 planches. Les variabilités intra-planche de l'a_w et du pH sont donc négligeables.

Tableau II.7. Comparaison de l'a_w et du pH en fonction de l'empreinte sur des planches de fin d'affinage.

Facteurs	a_w (n=30)		pH (n=30)	
	planche 7	planche 8	planche 9	planche 10
Moyenne ± et[1]	0,947 ± 0,0003	0,966 ± 0,0002	8,1 ± 0,11	7,6 ± 0,02
Empreintes	***[2]	***[2]	NS[3]	NS[3]
1 (n=3)	0,948 ± 0,0007[b]	0,969 ± 0,0005[c]	7,9 ± 0,24	7,5 ± 0,05
2 (n=3)	0,943 ± 0,0007[a]	0,965 ± 0,0005[b]	8,3 ± 0,24	7,5 ± 0,05
3 (n=3)	0,948 ± 0,0007[b]	0,967 ± 0,0005[bc]	8,0 ± 0,24	7,6 ± 0,05
4 (n=3)	0,947 ± 0,0007[b]	0,968 ± 0,0005[c]	7,9 ± 0,24	7,5 ± 0,05
5 (n=3)	0,948 ± 0,0007[b]	0,964 ± 0,0005[a]	8,1 ± 0,24	7,8 ± 0,05

[1] et : erreur type

[2] *** : P < 0,001

[3] NS : P >0,05

1.4 Etude de la variabilité inter et intra planche de 4 flores du biofilm

De même que pour les paramètres physico-chimiques, la variabilité des principales flores du biofilm sur une empreinte et sur une planche doit être évaluée.

L'analyse de cette variabilité intra-planche a été réalisée sur 2 planches d'âge moyen au stade fin d'affinage, après l'affinage de fromages de 2 origines différentes. Les prélèvements des consortia par ultra-sons et les dénombrements ont été effectués le lendemain de la collecte des planches, après un stockage à 4°C, en automne. Les prélèvements ont été effectués sur 4 empreintes par planche, avec 3 répétitions par empreintes soit 24 suspensions de décrochage. Le Tableau II.8 compare les dénombrements de 4 flores de 4 empreintes différentes de 2 planches. Pour ces 2 planches et pour toutes les flores dénombrées, aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence. Donc pour ces flores, les dénombrements d'une empreinte sont représentatifs de la planche.

Tableau II.8. Comparaison des dénombrements de 4 flores en fonction de l'empreinte sur les planches (Log(UFC/cm²)).

Facteurs	FMAR (n=24)		Levures-Moisissures (n=24)		Flore halophile (n=24)		Coliformes (n=24)	
	planche 11	planche 12	planche 11	planche 12	planche 11	planche 12	planche 11	planche 12
Moyenne ± et[1]	7,64 ± 0,081	7,23 ± 0,043	5,84 ± 0,041	6,00 ± 0,056	6,08 ± 0,105	5,84 ± 0,097	1,70 ± 0,375	0,33 ± 0,104
Empreintes	NS[2]	NS[2]	NS[2]	NS[2]	NS[2]	NS[2]	NS[2]	NS[2]
1 (n=3)	7,92 ± 0,162	7,92 ± 0,162	5,95 ± 0,078	6,00 ± 0,113	6,53 ± 0,211	5,86 ± 0,194	2,46 ± 0,749	0,55 ± 0,209
2 (n=3)	7,51 ± 0,162	7,51 ± 0,162	5,72 ± 0,078	5,99 ± 0,113	5,71 ± 0,211	5,65 ± 0,194	1,26 ± 0,749	0,19 ± 0,209
3 (n=3)	7,64 ± 0,162	7,64 ± 0,162	5,98 ± 0,078	6,04 ± 0,113	6,00 ± 0,211	5,91 ± 0,194	1,57 ± 0,749	0,39 ± 0,209
4 (n=3)	7,49 ± 0,162	7,49 ± 0,162	5,71 ± 0,095	6,00 ± 0,113	6,07 ± 0,211	5,97 ± 0,194	1,51 ± 0,749	0,21 ± 0,209

[1] et : erreur type

[2] NS : Non significatif

A partir de ces résultats, les coefficients de variations des 3 prélèvements par empreinte ont été calculés pour toutes les empreintes et toutes les flores. Ils étaient compris entre 0,2% et 9,0% (Tableau II.9), sauf pour les coliformes, ce qui signifie une relative homogénéité des dénombrements de la FMAR, des levures et moisissures et de la flore halophile, prélevées par ultrasons, au sein d'une empreinte. En revanche pour les coliformes, le coefficient de variation était dans certains cas bien supérieur à 10 %, reflétant la grande variabilité pour les dénombrements des coliformes au sein d'une empreinte.

Tableau II.9. Coefficients de variation des dénombrements de la FMAR, des levures moisissures, de la flore halophile et des coliformes effectués sur 2 planches de fin d'affinage (4 empreintes et 3 répétitions par empreinte) (Log(UFC/cm²)).

Planche	Empreinte	Coefficients de variation (%)			
		FMAR	Levures moisissures	Flore halophile	Coliformes
Planche 11	1 (n=3)	1,5	0,2	2,9	69,5
	2 (n=3)	1,2	3,5	8,2	96,0
	3 (n=3)	4,3	1,8	6,8	88,5
	4 (n=3)	5,6	2,6	5,3	41,0
Planche 12	1 (n=3)	2,6	2,5	9,0	98,3
	2 (n=3)	0,4	5,5	1,9	5,3
	3 (n=3)	3,0	0,8	6,4	84,6
	4 (n=3)	0,4	2,5	1,3	4,8

1.5 Etude de la cultivabilité de la FMAR après cryoconservation à –80°C

Afin de vérifier la représentativité des dénombrements d'un consortium cryoconservé, la cultivabilité de la FMAR d'un consortia au cours de la conservation à -80°C a été étudiée. Pour ce, un décrochage par ultrasons a été réalisé sur une planche de fin d'affinage d'âge moyen après l'affinage de fromages du producteur F. La suspension de décrochage a été stockée dans du lait glycériné à 10% (m/v), à -80°C, répartie dans plusieurs cryotubes. Régulièrement, un cryotube était décongelé et la FMAR dénombrée.

La Figure II.2 décrit la cultivabilité de la FMAR d'un consortium décroché par ultrasons au cours de la cryoconservation dans du lait glycériné à -80°C. Jusqu'à 7,5 mois, la cultivabilité de la FMAR ne semble pas être significativement affectée par la cryoconservation.

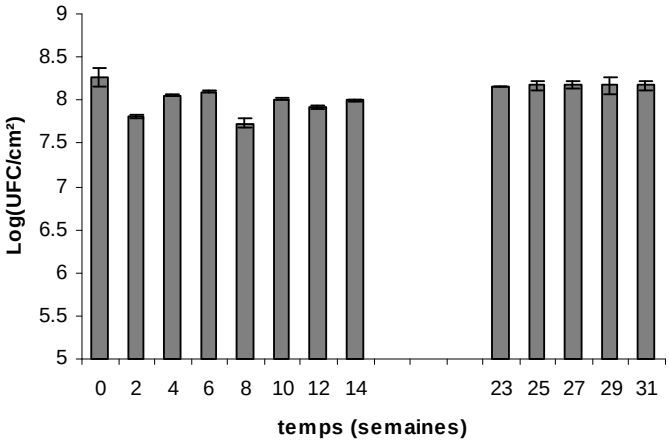


Figure II.2. Suivi de la cultivabilité d'un consortium décroché par ultrasons et cryoconservé dans du lait glycériné (10%, m/v) à -80°C.

Pour les paramètres physico-chimiques de surface des planches ainsi que pour certaines flores dont les flores majoritaires, les planches d'affinage de fin d'affinage sont caractérisées par une forte homogénéité au sein d'une même planche et d'une même empreinte. Cette homogénéité des flores, de l'a_w et du pH de l'écosystème microbien provient du temps de contact relativement important (6 à 9 jours) entre la planche et un même lot de fromages (origine, jour de fabrication).

2. Aspects environnementaux (physico-chimiques et biochimiques) des planches d'affinage

Pour affiner la compréhension des relations planche-consortium, l'objectif de cette partie était la caractérisation du biotope des planches. L'évolution de l'humidité des planches en fonction de l'ambiance, les paramètres physico-chimiques de surface (pH, a_w et taux de NaCl), et la matière organique présente à la surface des planches on été déterminés, afin d'évaluer l'influence du biotope sur les micro-organismes.

2.1 Courbes de sorption des planches et suivi de l'humidité des planches en caves

Pour la réalisation des courbes de sorption, 8 planches d'affinage au stade après nettoyage pour les 3 âges différents ont été sciées et analysées, soit un total de 24 planches. Les courbes de sorption de ces planches sont représentées sur la Figure II.3. L'âge des planches ne semble pas influencer les courbes d'absorption et de désorption des planches d'affinage dans une enceinte climatique, en l'absence de fromage. Les expérimentations reproduites ici n'ont pas permis de retrouver les observations de l'affineur quant à la différence de séchage des fromages en fonction de l'âge des planches. L'affineur a en effet observé que les planches jeunes (moins de 4 ans) séchaient plus les fromages que les planches plus âgées. Cette différence de séchage des fromages est surtout observée par l'affineur en cave 1, lorsque les fromages sont encore humides, par exemple après le lavage avec la solution salée. Ainsi, la différence de séchage en fonction de l'âge observée par l'affineur pourrait être liée plutôt à un phénomène de surface de la planche (rugosité, usure des fibres) qu'à la capacité hydrique globale de la planche.

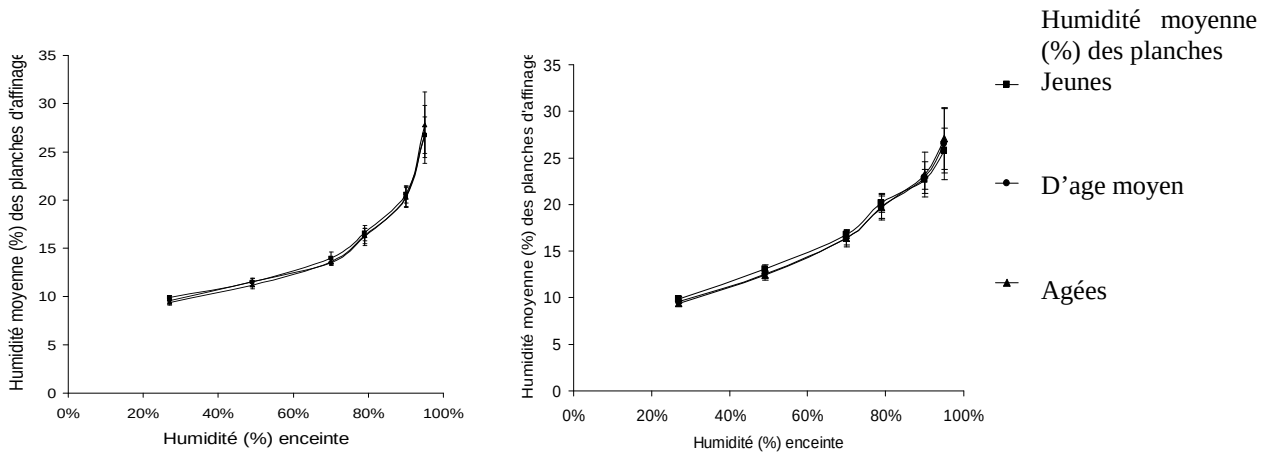


Figure II.3. Courbes d'absorption (A) et de désorption (B) des planches d'affinage en fonction de l'âge des planches. Jeune : planche de moins de 4 ans, d'âge moyen : planche de 5 à 8 ans, âgée : planche de plus de 8 ans. (H. Callot, CTBA).

Par la suite, les suivis d'humidité en caves d'affinage 2-3 ont été réalisés sur 3 planches d'âge moyen pendant l'affinage de fromages de 3 origines différentes (A, L, et D) (Figure II.4). Ces 2 caves ont été choisies car les planches restent en contact avec un même fromage pendant 6 à 9 jours. Sur la Figure II.4, l'équilibre semble atteint pour les planches au bout de 5 jours de contact, avec une humidité comprise entre 50 et 60%. Cette valeur est plus élevée que l'humidité d'équilibre atteint à 95 % HR pour les courbes de sorption, comprise entre 25 et 30%. Cette différence est due au transfert d'humidité du fromage vers la planche. Ainsi, les 3 planches ont absorbé de l'humidité provenant des fromages et de l'humidité ambiante des caves. Les différences d'évolution de l'humidité des 3 planches, observées entre 2 et 5 jours de contact, sont certainement à relier à l'humidité des fromages (3 origines différentes) puisqu'elles étaient entreposées dans les mêmes caves. Pour ce suivi, les fromages ne sont restés que 5 jours dans ces caves. Certains restent jusqu'à 9 jours, ce qui peut expliquer la variabilité des humidités au stade fin d'affinage (après 5 à 9 jours d'affinage) observée dans le Tableau II.5. Le flux d'humidité observé du fromage vers la planche peut aussi être porteur d'un flux de matière du fromage vers la planche pendant l'affinage, ce qui peut influencer le consortium à la surface des planches.

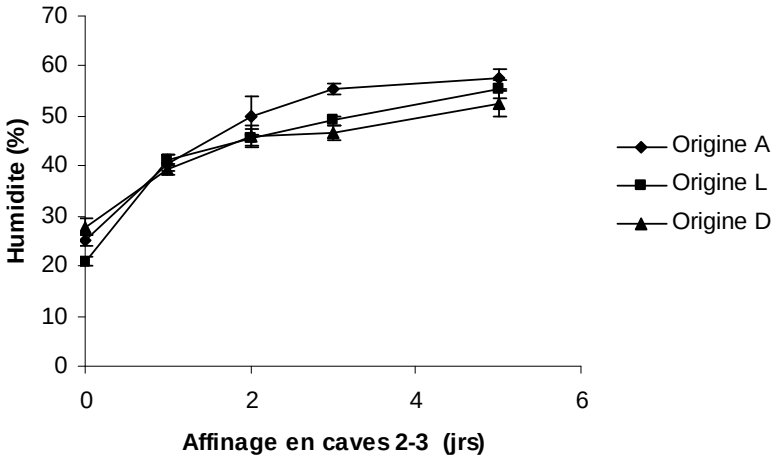


Figure II.4. Evolution de l'humidité en caves d'affinage 2 et 3 (13°C, 96-97 % HR) de 3 planches d'affinage supportant des fromages de 3 origines (A, L, D).

En raison du séchage et de l'échange d'humidité du fromage vers la planches, la caractérisation du biotope des planches doit être effectuer aux 2 stades fin d'affinage et après nettoyage.

2.2 pH, a_w, et taux de chlorure de sodium des planches au stade fin d'affinage.

Les paramètres physicochimiques de surface des planches (pH, a_w et taux de NaCl) au stade fin d'affinage ont été mesures sur un total de 40 planches durant l'automne 2004. Trois âges de planches ont été testés, jeune (moins de 4 ans), d'âge moyen (4 à 8 ans) et âgée (plus de 8 ans). Les planches analysées ont été utilisées pour affiner des fromages provenant de 8 origines différentes (producteurs A à H), choisies en fonction des différentes qualités organoleptiques des fromages (goût et texture). Les 40 planches analysées (8 origines x 5 planches (2 jeunes, 1 d'âge moyen, 2 âgées) ont servi aussi pour l'étude de l'écologie microbienne du stade fin d'affinage. Pour chaque planche, le pH, l'a_w et le taux de NaCl étaient déterminés sur 3 empreintes différentes. Le pH était déterminé par la méthode papier pH.

L'analyse de variance réalisée sur les 40 planches de fin d'affinage de l'étude automnale a révélé l'absence d'interactions entre l'âge des planches et l'origine des fromages affinés pour les paramètres de surface physico-chimique, le pH, l'a_w et le taux de NaCl. Le Tableau II.10

présente les valeurs des paramètres physicochimiques de la surface des planches d'âges différents (jeune, moyen et vielle) et l'origine des fromages (A à H).

Tableau II.10. Comparaison des valeurs physico-chimiques des planches d'affinage en fonction de l'âge des planches (jeune, moyenne, et âgées) et de l'origine des fromages affinées sur les planches (A à H).

Facteurs N=40	a_w	pH	Taux de sel mg/cm²
Moyenne ± et[1]	0,960±0,0004	7,6±0,06	0,14±0,003
Origine	***	**	*
A (n=5)	0,946±0,0012[d]	8,0±0,17 [a]	0,15±0,010[ab]
B (n=5)	0,971±0,0012[a]	7,6±0,17[ab]	0,11±0,010[b]
C (n=5)	0,957±0,0012[c]	7,6±0,17[ab]	0,16±0,010[ab]
D (n=5)	0,965±0,0012[b]	7,1±0,17[b]	0,13±0,010[ab]
E (n=5)	0,969±0,0012[b]	7,5±0,17[ab]	0,15±0,010[ab]
F (n=5)	0,969±0,0012[b]	7,7±0,17[ab]	0,17±0,010[a]
G (n=5)	0,957±0,0012[c]	7,2±0,17[b]	0,14±0,010[ab]
H (n=5)	0,942±0,0012[d]	8,3±0,17[a]	0,16±0,010[ab]
Age	NS[2]	NS[2]	***
Jeune (n=16)	0,959±0,0007	7,6±0,09	0,15±0,005[b]
Moyenne (n=8)	0,959±0,0009	7,6±0,12	0,16±0,008[a]
Agée (n=16)	0,960±0,0006	7,6±0,09	0,13±0,005[c]
Age x Origine	NS[2]	NS[2]	NS[2]

[a-d] Les lettres correspondent aux différents groupes statistiques.
[1]et : erreur type de la moyenne
[2]NS : Non Significatif
* : P < 0,05
** : P < 0,01
*** : P < 0,001

Pour toutes les planches, les valeurs d'a_w étaient relativement élevées (0,942 à 0,971), les valeurs de pH neutres à légèrement alcalin (7,1 à 8,3) et les valeurs de taux de NaCl faibles (0,11 à 0,17 mg/cm²). L'origine des fromages avait un impact statistiquement significatif sur l'a_w, le pH et le taux de NaCl (P < 0,05), alors que l'âge des planches ne semblait pas influencer ces 3 paramètres (pour le taux de NaCl, les variations observées étaient inférieures au seuil de précision estimé de cette technique de 0,06 mg/cm²). Les valeurs de pH de surface des planches sont légèrement plus élevées que le pH de la croûte de reblochon au stades fin d'affinage et consommation qui ont été évalué respectivement à 6,6 (Etude SCM, 2002-2004) et de 5,5 à 5,7 (Communication personnelle, B. Mathieu, SIR). De même, le taux de NaCl contenu dans le premier millimètre de

la planche (3 à 4 ‰ (m/m)) est inférieur au taux de chlorure de sodium dans le reblochon au moment de la consommation qui est de 1,3 à 1,6 % (m/m) (Communication personnelle, B. Mathieu, SIR).

L'âge des planches ne semblait pas influencer leurs paramètres physico-chimiques, notamment l'a_w, contrairement aux observations de l'affineur sur l'influence de l'âge des planches dans les échanges d'eau pendant l'affinage. L'affineur a observé les différences de séchage principalement en cave 1, lorsque les fromages sont encore humides. Dans cette cave, le contact planche-fromage n'est que de 24 h. Or, au vu de l'évolution de l'humidité en cave 2 et 3 (Figure II.4), l'équilibre pour l'humidité des planches n'est pas atteint après 24 h. Par contre, au stade fin d'affinage, l'humidité d'équilibre de la planche est atteinte. Il est donc possible que les différentes capacités de séchage en fonction de l'âge correspondent à des différences de cinétiques de séchage. Elles ne pourraient être mises en évidence que lorsque la planche est sèche, dans les premières heures du contact planche-fromage. Ce point pourrait expliquer les différences observées par l'affineur et l'absence d'influence de l'âge sur l'a_w L'absence d'influence de l'âge des planches sur l'a_w est par contre en accord avec les courbes de sorption réalisées sur des planches d'ages différents.

L'origine de fromages avait aussi une influence significative sur le pH et l'a_w, ce qui peut être relié avec des techniques de productions fromagères différentes pendant la fabrication et la phase de séchage. Les variations de pH entre les fromages d'origine différente peuvent être expliquées par la diversité microbienne, car les propriétés acidifiantes sont influencées par la population microbienne (Michel *et al*., 2001) et les levures sont responsables de l'augmentation de pH pendant l'affinage des fromages (Chamba et Irlinger, 2004).

Les différences d'a_w en fonction de l'origine peuvent être expliquées par des temps de contact entre les fromages et les planches différents, 5 à 9 jours de contact au stade fin d'affinage. Les 4 origines dont le temps de contact planche-fromage a été le plus court (A, C, G et H) sont aussi celles dont l'a_w des planches sont les plus basses (0,942 à 0,957). Cette remarque est à corréler avec la Figure II.4, qui montre que le temps de contact influence l'humidité des planches et qui peut jouer un rôle dans les valeurs d'a_w des planches.

Le faible taux de NaCl mesuré sur les planches (0,11 à 0,17 mg/cm²) est à mettre en relation avec les nettoyages réguliers des planches qui solubilisent le NaCl. De plus, la migration de ce composé en provenance du fromage dépend de la surface de contact avec le bois, qui dépend directement de l'état de surface des planches (rugosité). Enfin, il faut noter qu'un seul lavage des reblochons est effectué avec une solution salée, dans la première cave d'affinage, et non dans les caves 2 et 3.

Ainsi, au stade fin d'affinage, les conditions du biotope des planches sont favorables au développement microbien. L'âge des planches ne semble pas influencer les paramètres physico-chimiques de surface. L'origine des fromages semble par contre influencer le pH et l'a_w des planches, mais pas le taux de NaCl. L'influence exacte du temps de contact planche-fromage sur les valeurs d'a_w doit néanmoins être mesurée.

2.3 pH, taux de chlorure de sodium et a_w au stade après nettoyage

La caractérisation du biotope se poursuit avec l'étude des paramètres physico-chimiques de surface des planches pour le stade après nettoyage. Ce stade a été décrit par comparaison avec le stade fin d'affinage (ou avant nettoyage). Pour un même lot de fromage (origine C), les mesures des paramètres physico-chimiques ont été réalisées sur 2 planches de fin d'affinage et 2 planches après nettoyage, d'âges variables, après un transport de quelques heures en caisson isotherme. Ces mêmes planches ont été utilisées pour la comparaison microbiologique des stades avant et après nettoyage. Les comparaisons des valeurs de pH, d'a_w et de taux de NaCl sont détaillées dans le Tableau II.11. Alors que les valeurs de pH de surface ne sont pas significativement modifiées par le nettoyage, l'a_w chute considérablement lors du nettoyage, qui comprend une phase de séchage ventilé après un brossage mécanisé à l'eau du réseau. Ce résultat est en accord avec la chute d'humidité moyenne des planches (Tableau II.5). Pour la majorité des micro-organismes étudiés dans ce chapitre, cette valeur d'a_w (0,854) ne permet pas le développement bactérien, à part pour la flore halophile, qui peut se développer jusqu'à 0,75. La pratique du séchage entraîne une chute des valeurs de l'a_w qui sont plus restrictives pour le développement des microorganismes au stade après nettoyage. A ce stade de prélèvement, l'humidité des planches mesurée dans les caves est de 30,2% (m/m) (Tableau II.5). Revol-Junelles *et al*. (2005) ont démontré que 24 h après une inoculation d' *E. coli* ($2,4 \times 10^2$ cellules) sur un échantillon de

cagette en peuplier à 17% d'humidité (m/m), aucune bactérie n'était détectable par impédancemétrie à 25°C. Sur les planches d'affinage, le taux de NaCl reste très faible pour les 2 stades de prélèvement (précision de cette technique 0,06 mg/cm²).

Tableau II.11. Comparaison des valeurs d'a_w, de pH et du taux de sel des planches aux stades fin d'affinage et après nettoyage (brossage et séchage).

Moyenne ± écart-type	a_w (n=2)	pH (n=2)	Taux de sel (mg/cm²) (n=1)
Fin d'affinage	0,931 ± 0,002	7,75 ± 0,35	0,04
Après nettoyage	0,854 ± 0,006	7,5 ± 0,71	0,07

La caractérisation du biotope des planches d'affinage révèle que les conditions physico-chimiques de surface au stade fin d'affinage sont favorables au développement bactérien. La comparaison des 2 stades de prélèvement souligne en revanche le contraste entre ces 2 stades. En effet, le nettoyage et le séchage abaissent de manière significative l'a_w mais ne semble pas affecter les valeurs de pH. Au stade après nettoyage, les conditions de surface (a_w) ne sont favorables qu'aux flores halophiles, dont font partie les flores d'intérêt technologique.

2.4 Analyse biochimique d'une suspension de décrochage

Les analyses biochimiques ont été effectuées sur une suspension de décrochage (60 ml) prélevée par brossage sur 60 cm² d'une planche jeune au stade fin d'affinage, après un affinage de 5 jours des fromages de l'origine C.

La suspension de 60 ml a permis de calculer les quantités présentes en surface des planches au stade fin d'affinage de 6 constituants, dont les résultats sont reportés dans le Tableau II.12. Le calcul des quantités des constituants biochimiques présents sur les planches indique en fin d'affinage un environnement relativement pauvre en substances organiques, et donc en ressources nutritives pour le biofilm.

Tableau II.12. Principaux constituants biochimiques de la suspension de décrochage d'un biofilm de fin d'affinage prélevé par brossage (60 cm² dans 60 ml de ringer).

Analyse	Méthode	Suspension de décrochage	Calcul des constituants présents sur la planche (mg/cm²)
Lactate-D	Enzymatique	5,8 mg/l	$5,8\ 10^{-3}$
Lactate-L	Enzymatique	17,8 mg/l	$17,8\ 10^{-3}$
Lactose	Enzymatique	<0,2 g/100g	<2
Galactose	Enzymatique	<0,2 g/100g	<2
Matière grasse	NF EN ISO 1211, 2004	0,03 g/kg	0,03
Azote total	NF ISO 8968-1, 2002	<0,157gN/kg[1]	0,04

[1] 0.039 gN/kg

2.5 Etude par spectroscopie infra rouge des composés organiques de la surface des planches

L'analyse biochimique directe d'une suspension de décrochage étant limitée par les faibles quantités des composants recherchés, des analyses par IRTF ont été réalisées pour obtenir des informations qualitatives et semi-quantitatives sur les composants moléculaires présents à la surface des planches. Les analyses par IRTF ont été réalisées sur 2 planches d'âge moyen au stade fin d'affinage (ou avant nettoyage) et après nettoyage. Elles avaient été utilisées pour affiner des fromages du producteur F et le transport a été réalisé entre 2 planches avec du film alimentaire pendant 2 h dans le caisson de transport. Ces mêmes planches ont servi pour les observations au Microscope Electronique à Balayage et au microscope confocal laser à balayage. Avant l'analyse par IRTF, ces planches sont été séchées à température ambiante durant plusieurs jours.

Une étude bibliographique et l'analyse des spectres IRTF de composés purs extraits de fromage et de flores caractéristiques de surface des fromages, réalisés au laboratoire ont permis les attributions des bandes des spectres IRTF des planches. La Figure II.5 représente les spectres IRTF normalisés de planches aux stades de fin d'affinage et après nettoyage, d'une planche neuve et d'une croûte de reblochon de fin d'affinage. Les 4 régions spectrales (2990-2820 cm^{-1}, 1780-1485 cm^{-1}, 1485-1180 cm^{-1}, et 1180-920 cm^{-1}) correspondant respectivement aux lipides, aux protéines, à une zone mixte, et aux sucres sont représentées sur cette figure. Un

agrandissement de la région spectrale des protéines (1780-1485 cm^{-1}) a été réalisé. L'attribution des bandes a été réalisée à partir des dérivées secondes des spectres (Tableaux II.13 et II.14).

Les différences spectrales entre la planche neuve et la planche de fin d'affinage indiquent que la composition moléculaire de ces 2 échantillons est différente. Dans la mesure où un biofilm recouvre le bois sur une planche de fin d'affinage, le profil spectral de la planche de fin d'affinage correspondrait au biofilm présent sur cette planche. Les profils spectraux de la planche neuve et de la planche après nettoyage sont différents, sauf pour la région des lipides et des protéines où une forte similitude entre ces 2 spectres peut être observée. Ainsi, le brossage à l'eau froide des planches permettrait d'éliminer une partie des protéines et des lipides présents sur la planche. Des bandes de ces 2 régions (lipides et protéines) pourraient être utilisé comme marqueurs spectroscopiques pour caractériser le brossage des planches.

Sur l'agrandissement de la zone des protéines de 1780 à 1485 cm^{-1}, les profils spectraux des planches de fin d'affinage et après nettoyage ont des allures équivalentes mais l'absorbance est moins élevée pour le spectre de la planche après nettoyage. Les 2 biofilms présents sur ces planches ont donc des compositions moléculaires protéiniques proches, mais la quantité de protéines est moindre pour la planche après nettoyage. Pour cette zone, les profils spectraux de la planche de fin d'affinage et de la croûte de reblochon se superposent, ce qui se traduit par une composition moléculaire protéinique identique.

En conclusion, la composition moléculaire du biofilm d'une planche de fin d'affinage est donc proche de celle de la croûte de reblochon. Il est à noter également que les opérations de nettoyage (brossage à l'eau froide et séchage) des planches éliminent une partie des composés organiques présents sur les planches, notamment les lipides et les protéines.

Les substances nutritives présentes sur les planches d'affinage sont donc d'une nature proche de celles de la croûte du reblochon. Bien qu'en quantité peu importante au stade fin d'affinage, le nettoyage (brossage et séchage) des planches élimine une partie de ces substances nutritives, ce qui suggère l'importance du contact avec les fromages comme apport nutritif.

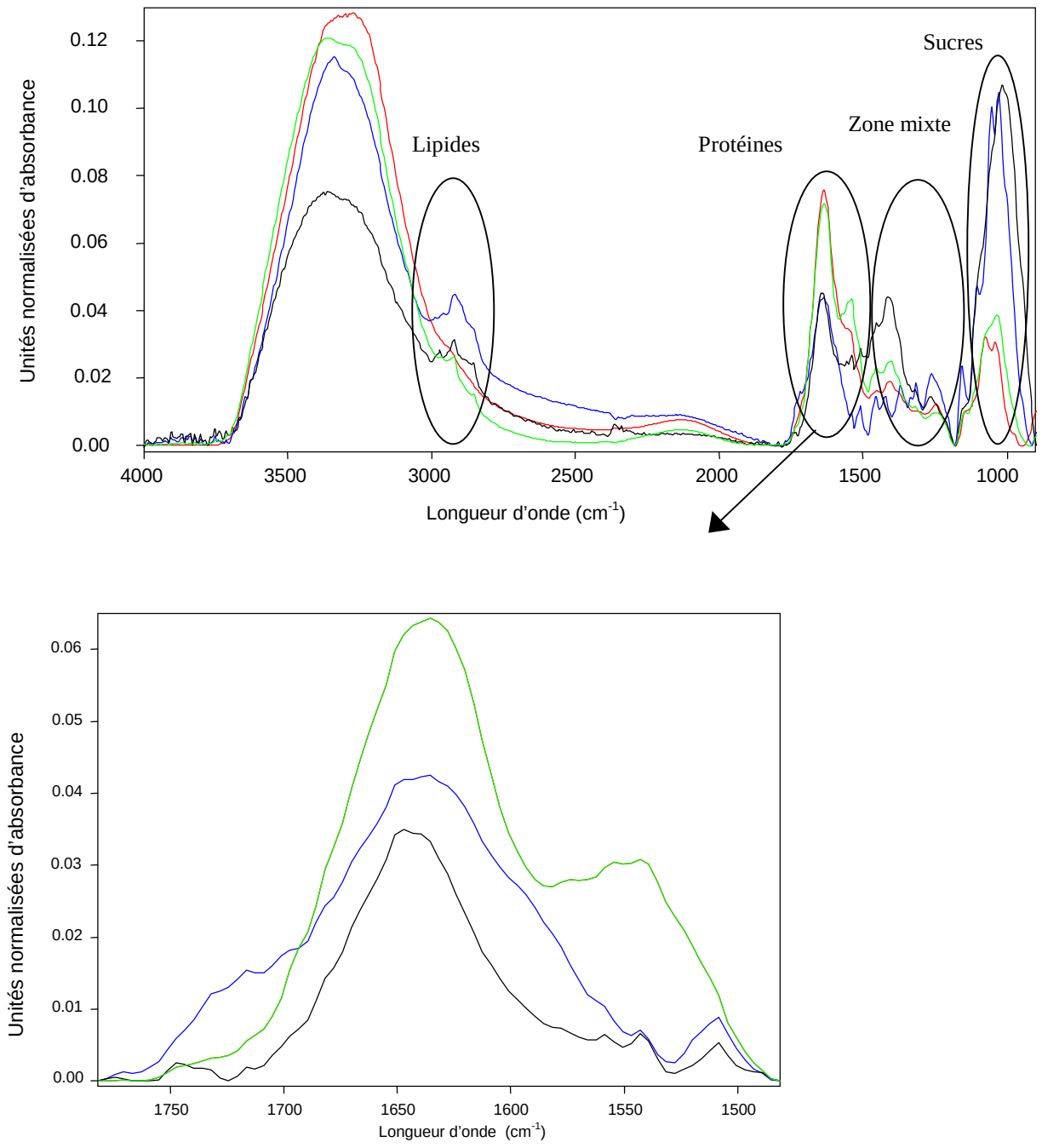


Figure II.5. Comparaison des spectres IRTF normalisés de planches aux stades de fin d'affinage (vert) et après nettoyage (noir), d'une planche neuve (bleu) et d'une croûte de Reblochon de fin d'affinage (rouge), avec un agrandissement des spectres dans la zone d'absorbance 1780-1485 cm^{-1} (protéines) (A. Carnet et I. Adt, LRGIA).

Tableau II.13. Identification des pics de la zone des lipides et des protéines des profils IRTF

	Bandes (cm^{-1})	Attribution	Spécificité de la bande dans le contexte de l'étude	Références
Zone des lipides	2850	liaison CH_2 des lipides, liaison CH_2 de la cellulose		Adt et al., 2006 Naumann et al., 2005
	2851			
	2852			
	2879	liaison CH_3 des lipides		Adt et al., 2006
	2880			
	2896	liaison CH des groupes méthyl	bande spécifique du bois	Naumann et al., 2005
	2920	liaison CH_2 des lipides et lactate/perméat		Adt et al., 2006 Spectres témoins
	2921			
	2930			
	2944	non attribué		
	2960	liaison CH_3 des lipides		Adt et al., 2006
	2961			
	2962			
	2973	non attribué		
Zone des protéines	1510	squelette aromatique de la lignine	bande spécifique du bois	Naumann et al., 2005
	1516	tyrosine (mouvement du cycle)		Adt et al., 2006
	1544	amide II (feuillet β antiparallèle) et matière grasse fromage		Adt et al., 2006 Spectres témoins
	1545			
	1586	squelette aromatique de la lignine	bande spécifique du bois	Naumann et al., 2005
	1627	amide I		Adt et al., 2006
	1628			
	1641	amide I (feuillet β antiparallèle) et liaisons (OH) et (C=O) du bois		Naumann et al., 2005
	1645			
	1671	amide I (feuillet β parallèle)		Adt et al., 2006
	1674			
	1691	amide I	bande spécifique du bois	Adt et al., 2006
	1693			
	1725	liaison (C=O) : esters et lipides, polysaccharides, xylène de l'hémicellulose	bande spécifique du bois	Adt et al., 2006 Naumann et al., 2005
	1742	non attribué		

Tableau II.14. Identification des pics de la zone mixte et de la zone des sucres des profils IRTF

	Bandes (cm^{-1})	Attribution	Spécificité de la bande dans le contexte de l'étude	Références
Zone mixte	1204	non attribué		
	1205			
	1208			
	1230	liaison (P=O) de PO_2 des acides nucléiques et phospholipides		Adt et al., 2006
	1234			
	1244			
	1266	liaison (C=O) de la lignine	bande spécifique du bois	Naumann et al., 2005
	1267			
	1308	non attribué		
	1313			
	1315			
	1337	liaison (C-H) de la cellulose	bande spécifique du bois	Remazeilles et al., 2000
	1339			
	1371	déformation (C-H) de la lignine et l'hémicellulose	bande spécifique du bois	Naumann et al., 2005
	1374			
	1375			
	1406	liaison CH_2 et CH_3 des protéines liaison (C-O) du groupe COO-		Adt et al., 2006
	1409			
	1415			
	1423	liaison (C-O) de COO- et déformation (C-H) de la lignine	bande spécifique du bois	Naumann et al., 2005
	1459	liaisons (C-H) de CH_2 et CH_3 (épaulements) protéines, lipides et lignine		Adt et al., 2006 Naumann et al., 2005
	1460			
Zone des sucres	946	mananes de la paroi de *Geotrichum candidum* à confirmer	bandes spécifiques des planches fin d'affinage et après nettoyage	Adt et al., 2006 Spectres témoins
	976	mananes de la paroi de *Geotrichum candidum*		
	989	non attribué		
	1025	liaison (C-O) du glycogène, polysaccharides, mananes de la paroi de *Geotrichum candidum*		Adt et al., 2006 Spectres témoins
	1027			
	1030			
	1036			
	1057	liaison (C-O) de la cellulose et de l'hémicellulose	bande spécifique du bois	
	1078	liaison (C-O-C) du glycogène, liaison (P=O) des acides nucléiques, cellulose et hémicellulose, galactose, phosphate Na et lactosérum		Adt et al., 2006 Spectres témoins Naumann et al., 2005
	1106	polysaccharides		Adt et al., 2006
	1110			
	1151	liaisons (C-O-C) et (C-C) du glucose, liaison (C-O-C) des esters, cellulose et hémicellulose		Adt et al., 2006 Naumann et al., 2005
	1154			
	1156			
	1159			

Ainsi, le stade fin d'affinage est caractérisé par des conditions de surface favorables au développement bactérien et la présence de matière organique en faible quantité. Le stade après nettoyage n'est favorable qu'au développement des flores halophiles et il présente moins de matière organique que le stade fin d'affinage donc moins de substances nutritives pour les micro-organismes.

3. Description microbiologique du biofilm

Après la caractérisation du biotope des planches, les grands groupes microbiens présents à la surface des planches ont été dénombrés sur géloses sélectives, et les relations planche-consortium en fonction du stade de prélèvement déduites.

3.1 Description microbiologique du stade fin d'affinage

Pour la description microbiologique des planches prélevées au stade fin d'affinage, un total de 50 échantillons prélevés sur 50 planches a été analysé, 10 durant l'été et 40 pendant l'automne. Trois âges de planches ont été testés pendant l'automne, jeune (moins de 4 ans), d'âge moyen (4 à 8 ans) et âgée (plus de 8 ans), mais seulement les 2 classes d'âge extrême pendant l'été. Les planches échantillonnées ont été utilisées pour affiner des fromages provenant de 8 origines différentes (producteurs A à H) pour l'automne et 5 origines différentes pour l'été (producteurs A à E). Ces origines ont été choisies en fonction des différentes qualités organoleptiques des fromages (goût et texture).

Ainsi, pour l'étude automnale, les analyses microbiologiques ont été réalisées à partir de 40 planches utilisées pour la détermination des valeurs physico-chimiques de surface (8 origines x 5 planches (2 jeunes, 1 d'âge moyen, 2 âgées). Le jour de la collecte des planches chez l'affineur, après un transport dans le caisson isotherme, deux prélèvements par planche ont été réalisés sur deux empreintes différentes par ultrasons. Les consortia ont été cryoconservés pendant 5 mois. Les flores dénombrées étaient la FMAR, les bactéries corynéformes, les levures et moisissures, les leuconostocs, les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs, les entérocoques, les staphylocoques spp, et les *Pseudomonas* spp.

3.1-1 Groupes microbiens présents à la surface de planches au stade fin d'affinage en fonction de l'âge des planches.

L'analyse de variance des dénombrements microbiens, réalisée sur les 40 planches de l'étude automnale, a révélé l'absence d'interactions entre l'âge et l'origine des fromages pour tous les groupes microbiens analysés. La Figure II.6 résume les dénombrements de la flore d'altération, de la flore lactique et des bactéries corynéformes, et des levures et moisissures en fonction de l'âge des planches. Les bactéries corynéformes (7,2 à 7,3 Log(UFC/cm²)) et les levures moisissures (6,0 à 6,1 Log(UFC/cm²)) sont les flores dominantes, elles font partie de la flore technologique de surface du reblochon de Savoie. Parmi les levures et les moisissures, *Geotrichum candidum* était l'espèce la plus dénombrée. Des leuconostocs (3,7 Log(UFC/cm²)), des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (2,2 Log(UFC/cm²)), et des entérocoques (3,1 Log(UFC/cm²)) ont aussi été dénombrés en moindre quantité sur les planches d'affinage. Des staphylocoques spp (3,2 Log(UFC/cm²)) et des *Pseudomonas* spp (3,0 Log(UFC/cm²)) ont aussi été dénombrés dans les 80 échantillons. Aucune différence statistique n'a été mise en évidence entre les différentes classes d'âge des planches pour tous les groupes microbiens dénombrés ($P < 0,05$).

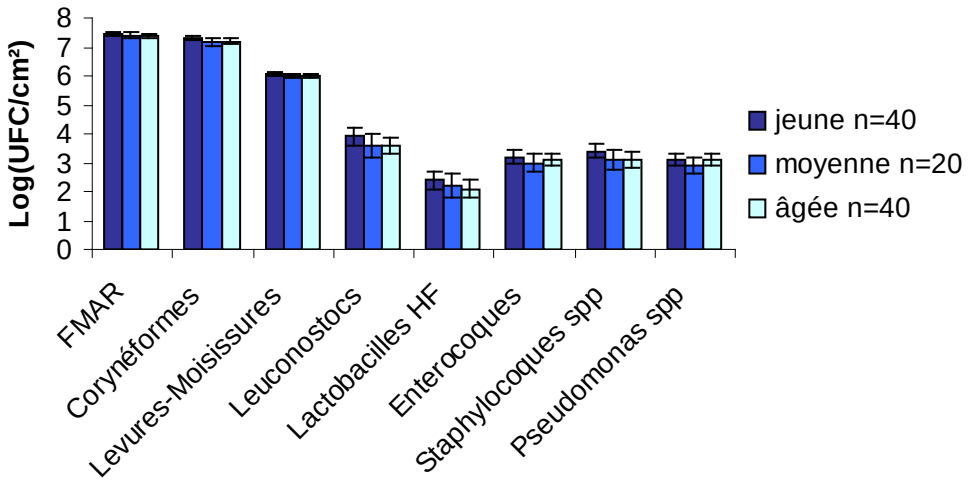


Figure II.6. Effet de l'âge des planches sur les dénombrements de la FMAR et de 7 groupes microbiens présents sur les planches d'affinage (Log(UFC/cm²)). Les barres d'erreur indiquent les intervalles de confiance ($P < 0,05$). Jeune : planche de moins de 4 ans, moyenne : planche de 5 à 8 ans, âgée : planche de plus de 8 ans. FMAR : Flore Mésophile Aérobie Revivifiable. HF : Heterofermentaire Facultatif.

Ces résultats montrent que les groupes microbiens présents sur les planches d'affinage sont en très forte relation avec les groupes microbiens de la croûte du fromage. En effet, les principaux groupes microbiens de la croûte de reblochon de Savoie en fin d'affinage sont les bactéries corynéformes ainsi que les levures, surtout *Geotrichum candidum* (Bärtschi *et al*., 1994 ; Etude SCM, 2002-2004). Ce résultat est en accord avec l'étude de Mounier *et al*. (2006) sur le fromage « gubbense cheese » et l'étude ACTIA n°RA97-31 (2000) sur plusieurs fromages (reblochon, tomme, beaufort, abondance). Des différences sont toutefois notables. Sur les planches, *Geotrichum candidum* apparaît comme la principale levure dénombrée sur les boîtes de Pétri, alors qu'à la surface du fromage, la population levurienne était assez diversifiée (Bärtschi *et al*., 1994 ; Etude SCM, 2002-2004). Les influences du bois ou des techniques d'affinage différentes pouvaient expliquer la prédominance des *G. candidum* sur les planches. Dans l'étude de Mounier *et al*. (2006), les flores de surface d'un fromage à croûte lavée (gubbense cheese, proche du reblochon) ont été comparées par PFGE avec les flores des caves et des salles de fabrication. Certaines flores dominantes de la surface du fromage, *Debaryomyces hansenii*, *Corynebacterium casei* et *C. variabile*, ont aussi été trouvées sur la surface des planches en bois et non sur des supports en acier inoxydable. Par contre, pour les autres groupes microbiens, minoritaires, il n'y avait pas de données sur la croûte de reblochon pour comparer avec les valeurs à la surface des planches. Dans la pâte du fromage, les dénombrements des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et des leuconostocs étaient classiquement aux alentours de 5 à 6 Log(UFC/g) (Communication personnelle, B. Mathieu, SIR). Sur les planches, ces 2 flores ne sont pas dominantes (< 4 Log(UFC/cm²)), tout comme sur la croûte des fromages. Pour les entérocoques, certaines souches sont connues pour leur intérêt technologique, mais d'autres sont indésirables dans le fromage (Giraffa, 2003). La présence de staphylocoques est aussi ambivalente : certaines espèces à coagulase négative ont aussi un intérêt technologique (lypolyse, protéolyse, production de pigments et activité antimicrobienne) (Chamba et Irlinger, 2004), mais d'autres sont pathogènes, notamment les staphylocoques à coagulase positive. L'absence d'identification des espèces d'entérocoques et de staphylocoques ne permet pas de conclure quant aux dangers associés à la présence de ces 2 flores sur les planches. Cependant, les faibles dénombrements des staphylocoques spp (moyenne 3,1 Log(UFC/cm²)) sur les planches sont à comparer avec le seuil de 4 Log(UFC/g) de staphylocoques à coagulase positive accordé par l'Union Européenne (Règlement n°2073/2005 du 15 Novembre 2005). Les toxines staphylococciques ne sont recherchées qu'au delà de 5 Log(UFC/g). Dans l'affinage des fromages, les *Pseudomonas* spp

sont considérés comme une flore d'altération car certaines espèces peuvent induire des défauts de goût ou des taches fluorescentes sur la croûte des fromages (Gram *et al*., 2002). Cette flore est recherchée dans le lait destiné à la production fromagère en cas de défaut visuel sur la croûte des fromages. L'environnement des planches ne semble pas favorable à la croissance des *Pseudomonas* spp, ils n'ont effectivement été dénombrés qu'en faible quantité (3,0 Log(UFC/cm²)). Malgré un aspect visuel des planches et une capacité de séchage différents en fonction de l'âge, ce facteur ne semblait pas influencer l'écosystème microbien.

3.1-2 Groupes microbiens présents à la surface de planches au stade fin d'affinage en fonction de l'origine des fromages.

Les niveaux de population des différents groupes microbiens en fonction de l'origine des fromages (A à H) sont résumés sur le Tableau II.15 pour les flores majoritaires et la Figure II.7 pour les flores minoritaires. La FMAR et les flores dominantes (bactéries corynéformes, levures et moisissures) ont révélé une remarquable homogénéité entre les 8 origines de fromage. Les écarts les plus importants pour la FMAR, les bactéries corynéformes (sauf pour l'origine B) et les levures et moisissures étaient respectivement de 0,56, 0,81 et 0,33 Log(UFC/cm²). Les planches utilisées pour l'affinage des fromages de l'origine B avaient un dénombrement de bactéries corynéformes inférieur d'environ 1 à 1,5 Log(UFC/cm²). L'origine des fromages affinés sur les planches avait une influence significative sur les groupes microbiens minoritaires. Le choix des origines a en effet été effectué sur la base de caractéristiques organoleptiques différentes des fromages. Les flores microbiennes naturellement présentes dans le lait sont influencées par les environnements de traite et d'élevage, et elles ont une répercussion sur les qualités organoleptiques des fromages, comme la flore naturelle du lait (Michel *et al*., 2001 ; Montel *et al*., 2003). Les relations entre les qualités organoleptiques des fromages et les profils microbiens sont complexes et non élucidés à ce jour. A titre d'exemple, pour le fromage salers, le goût « amer » a été associé à 8 pics de profil SSCP dont des pics correspondant à *Bacillus* sp., à des Enterobacteriaceae, et *Enterococcus faecium*. La texture « onctueuse » a été associée à 17 pics de profil SSCP dont *Leuconostoc pseudomesenteroides* et *Lactococcus lactis* (Duthoit *et al*., 2005).

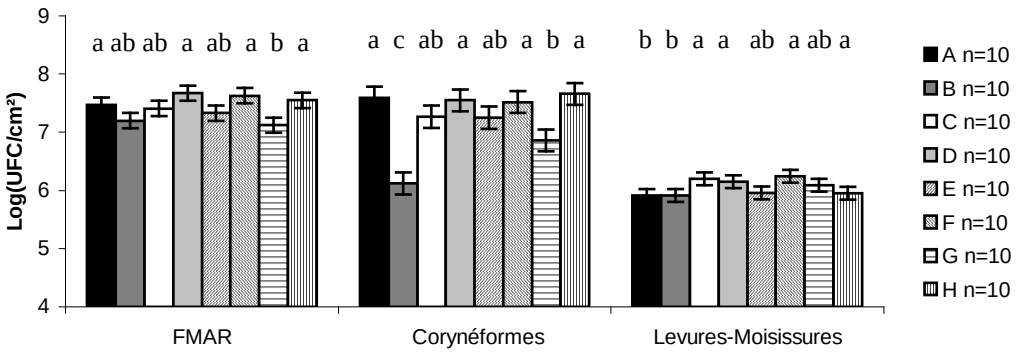


Figure II.7. Effet de l'origine des fromages affinés sur planches (A à H) sur les dénombrements de la FMAR, des bactéries corynéformes, et des levures-moisissures présents sur les planches (Log(UFC/cm²)). Les barres d'erreur indiquent les intervalles de confiance (P < 0,05). Les lettres correspondent aux différents groupes statistiques. FMAR : Flore Mésophile Aérobie Revivifiable.

Tableau II.15. Comparaison des dénombrements de 5 groupes microbiens présents sur les planches d'affinage (Log(UFC/cm²)) en fonction de l'origine des fromages affinés sur les planches.

Moyenne ± et[1] N=80	Leuconostocs	Lactobacilles Hétérofermentaires Facultatifs	Entérocoques	Staphylocoques spp	*Pseudomonas* spp
Origine	***	***	***	***	***
A (n=10)	4,3±0,27[a]	2,4±0,29[ab]	3,2±0,21[b]	2,9±0,25[b]	0,9±0,20[d]
B (n=10)	4,5±0,27[a]	1,4±0,29[b]	4,0±0,21[ab]	4,8±0,25[a]	4,8±0,20[a]
C (n=10)	2,8±0,27[b]	1,4±0,29[b]	2,2±0,21[c]	2,1±0,25[b]	2,5±0,20[c]
D (n=10)	3,2±0,27[b]	2,1±0,29[b]	3,3±0,21[b]	3,1±0,25[b]	3,6±0,20[b]
E (n=10)	3,6±0,27[ab]	2,0±0,29[b]	2,6±0,21[c]	3,0±0,25[b]	3,5±0,20[b]
F (n=10)	4,6±0,27[a]	3,8±0,29[a]	4,3±0,21[a]	3,9±0,25[a]	4,4±0,20[a]
G (n=10)	3,2±0,27[b]	2,0±0,29[b]	2,2±0,21[c]	2,8±0,25[b]	2,5±0,20[c]
H (n=10)	3,4±0,27[b]	2,8±0,29[ab]	3,1±0,21[bc]	3,0±0,25[b]	1,5±0,20[d]

[a-d] Les lettres correspondent aux différents groupes statistiques.
[1]et : erreur type de la moyenne
*** : P < 0,001

Au stade fin d'affinage, l'âge des planches n'influence pas les dénombrements des grands groupes microbiens présents sur les planches. L'origine des fromages n'influence pas les dénombrements de la FMAR et des flores majoritaires (bactéries corynéformes et levures moisissures), à la différence des flores minoritaires.

3.1-3 Groupes microbiens présents à la surface de planches au stade fin d'affinage en fonction de la saison.

Pour étudier l'influence de la saison, les résultats de l'étude automnale des planches des classes d'âges extrêmes et sur lesquelles ont été affiné des fromages des origines A à E, ont été comparés avec les résultats de l'étude estivale. Cette comparaison a été effectuée pour 35 planches : 10 pour l'étude estivale (5 origines x 2 planches-1 jeune, 1 âgée) et 25 planches de l'étude automnale (5 origines x 5 planches -2 jeunes, 1 d'âge moyen, 2 âgées). Pour l'étude estivale, les décrochages ont été effectués dans les caves d'affinage, et les suspensions de décrochage conservées à 4°C, dénombrées dans les 24 h suivants.

Les résultats des dénombrements des études estivales et automnales sont représentés sur la Figure II.8. Pour la majorité des groupes microbiens, l'influence de la saison n'a pu être mise en évidence ($P < 0,05$) sauf pour les staphylocoques spp et les *Pseudomonas* spp. Pour ces 2 groupes, les dénombrements ont augmenté de 1 Log(UFC/cm²) pour les staphylocoques et de 1,4 Log(UFC/cm²) pour les *Pseudomonas* spp entre l'été et l'automne ($P < 0,001$ et $P = 0,029$ respectivement). Certaines différences ont été observées entre les origines de fromages : les planches des fromages de l'origine B ont montré une diminution de la FMAR (0,72 Log(UFC/cm²)) ($P < 0,001$), des bactéries corynéformes (1,23 Log(UFC/cm²)) ($P < 0,001$) (données non montrées). Les planches des fromages de l'origine A ont aussi montré une diminution significative des dénombrements des *Pseudomonas* spp (1,0 Log(UFC/cm²), $P = 0,005$) (données non montrées). Les coliformes sont un autre groupe de flores d'altération, qui ont été dénombrées à de très faibles quantités pendant l'étude estivale (< 2,2 Log(UFC/cm²)). Les saisons peuvent en effet avoir un impact sur les dénombrements microbiens selon les équipements et les locaux d'affinage. Les températures des caves et des locaux de traite peuvent évoluer de quelques degrés en fonction de la saison et modifier les flores.

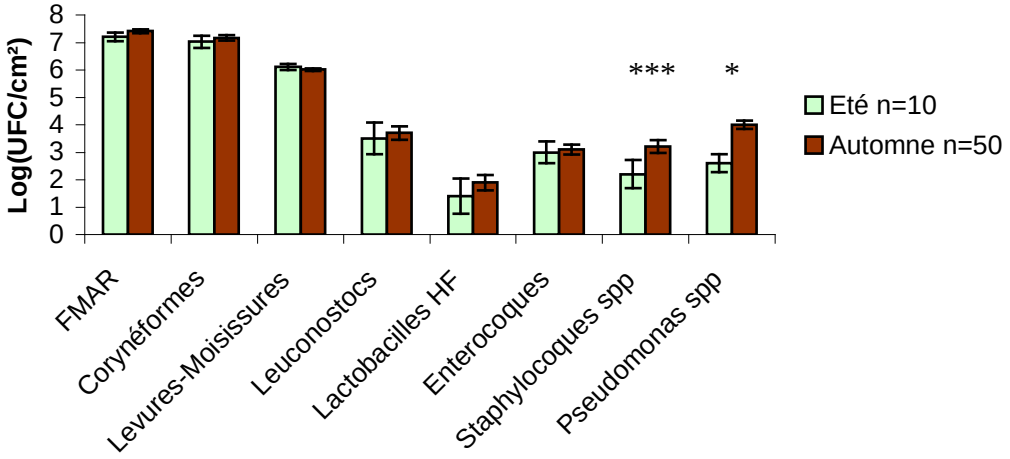


Figure II.8. Effet de la saison sur les dénombrements de la FMAR et de 7 groupes microbiens présents sur les planches d'affinage (Log(UFC/cm²)). Les barres d'erreur indiquent les intervalles de confiance (P < 0,05). Eté : consortia collectés de juin à juillet 2004. Automne : consortia collectés d'octobre à novembre 2004. *** : P < 0,001, * : P < 0,05. FMAR : Flore Mésophile Aérobie Revivifiable. HF : Hétérofermentaire Facultatif.

La Figure II.8 montre aussi clairement que les intervalles de confiance sont plus faibles pour la FMAR et les flores dominantes que pour les autres flores. Ce résultat souligne la stabilité dans le temps des flores majoritaires présentes sur les planches d'affinage. De plus, les coliformes ont aussi été dénombrés pendant l'étude estivale : tous les dénombrements étaient inférieurs à 2,2 Log(UFC/cm²) et 7 dénombrements sur 16 étaient inférieurs à 0,3 Log(UFC/cm²).

Ainsi, une relative homogénéité des dénombrements de la FMAR et des flores majoritaires (bactéries corynéformes et levures) a été démontrée au stade fin d'affinage en fonction de l'âge des planches, de l'origine des fromages et de la saison. Les flores minoritaires ne sont pas influencées par l'âge des planches, mais par l'origine et pour certaines par la saison.

Afin de classer les différentes origines, une Analyse Fractionnelle de Correspondance Simple (AFCS) a été réalisée sur les dénombrements des flores microbiennes minoritaires de l'étude

estivale (16 planches : 2 classes d'âge extrême et 8 origines (A à H)) (Figure II.9). Cette analyse montre que le positionnement des 8 origines des fromages dépend principalement des staphylocoques spp, des *Pseudomonas* spp, des coliformes et des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs.

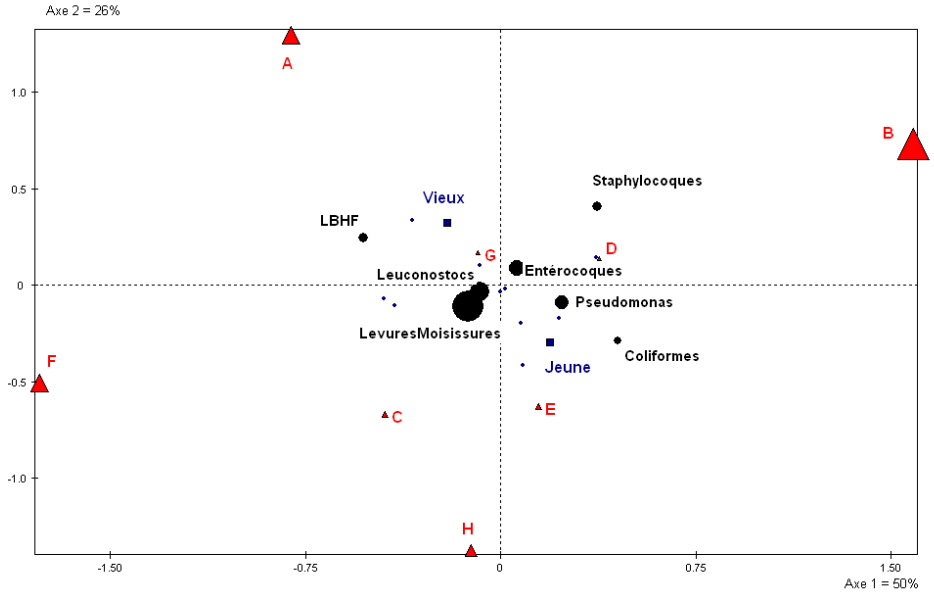


Figure II.9. Analyse Factorielle de Correspondance Simple (AFCS) des différentes origines en fonction des flores minoritaires dénombrées au stade fin d'affinage lors de l'étude estivale sur 16 planches (2 classes d'âge extrême et 8 origines (A à H)). LBHF : Lactobacilles Hétérofermentaires Facultatifs.

Au stade fin d'affinage, des corrélations entre les valeurs des paramètres physico-chimiques de surface des planches et les dénombrements des groupes microbiens n'ont pas révélé de fortes relations statistiques. En effet, seule une faible corrélation a été observée entre l'a_w et les *Pseudomonas* spp (R^2 = 0,64, P < 0,001). Ceci peut être expliqué par (i) les faibles variations mises en évidence pour les flores en fonction de l'âge et de l'origine des fromages, (ii) l'influence favorable des valeurs de pH neutres, des fortes valeurs d'a_w et des faibles valeurs de taux de NaCl sur la croissance microbienne, sauf pour les 2 valeurs les plus faibles d'a_w (0,942 et 0,947) pour les *Pseudomonas* spp. En effet, la majorité des levures peuvent se développer entre des valeurs d'a_w de 0,87 à 0,94, les bactéries lactiques de 0,91 à 0,95, les bactéries halophiles à

partir de 0,75 et les *Pseudomonas* spp à partir de 0,95 (Banwart, 1989 ; Guiraud, 1998). Les valeurs de pH des planches (7,1 à 8,3) sont aussi favorables à la croissance bactérienne. Les pH maximums permettant la croissance sont de 9,0 pour la majorité des bactéries et de 8,0 à 8,5 pour la majorité des levures (Banwart, 1989). Les *G. candidum* peuvent se développer pour des grandes variations de pH (3 à 10) et les bactéries corynéformes pour une zone de pH proche de la neutralité (6 à 8,5) (Gueguen et Schmidt, 1992 ; Bergère et Tourneur, 1992). Les taux de NaCl ont été déterminés sur le premier millimètre de la planche, qui correspond à la zone de colonisation des micro-organismes sur les planches (Programme ACTIA, n° RA 97-31, ITFF, 2000). Toutes les valeurs mesurées sont comprises entre 3 et 4 ‰ (m/m), ce qui a une faible influence sur la croissance microbienne (à titre de comparaison, le taux de NaCl dans l'eau physiologique est de 9 ‰ (m/m)).

Le stade fin d'affinage est donc caractérisé par une forte homogénéité de la FMAR et des flores majoritaires, qui se développent dans des conditions de pH et d'a_w non limitantes.

3.2 Description microbiologique du stade après nettoyage

Le stade après nettoyage a été décrit par comparaison avec le stade fin d'affinage sur les mêmes planches que la comparaison des valeurs physico-chimiques de surface. Pour un même lot de fromage (origine C), des prélèvements par brossage ont été réalisés sur 2 planches de fin d'affinage et 2 planches après nettoyage, d'âges variables, après un transport de quelques heures en caisson isotherme. Les prélèvements ont été effectués pendant l'automne. Les consortia ont été cryoconservés et dénombrés 3 mois après. Les flores dénombrées étaient les mêmes que précédemment.

Les dénombrements des flores présentes sur les planches d'affinage aux stades fin d'affinage et après nettoyage sont présentés sur la Figure II.10. Les diminutions de population les plus importantes ont été observées pour les levures moisissures (2,1 Log(UFC/cm²), $P < 0,01$), les *Pseudomonas* spp et les coliformes (respectivement 2,2 et 2,0 Log(UFC/cm²), $P < 0,05$). Les populations de 2 autres flores diminuent significativement : les bactéries corynéformes et la flore acidifiante mésophile (1,1 Log(UFC/cm²) pour les 2 groupes, $P < 0,05$). Pour les autres flores, les dénombrements diminuent après le nettoyage (de 0,2 à 1,2 Log(UFC/cm²)) mais non

significativement. Les opérations de nettoyage (brossage à l'eau froide et séchage) pratiqué par l'affineur ne modifie donc pas les grands équilibres entre les flores sauf pour les levures moisissures, qui deviennent minoritaires. Le brossage à l'eau froide, phénomène peu intense, semble décrocher surtout les cellules les plus grandes, *Geotrichum candidum*. L'action du séchage semble surtout être visible sur les dénombrements de *Pseudomonas* spp, dont la diminution est plus importante que pour les autres flores. En effet, parmi les flores dénombrées, les *Pseudomonas* spp sont les plus sensibles à la dessiccation (Pellet *et al*., 1983)).

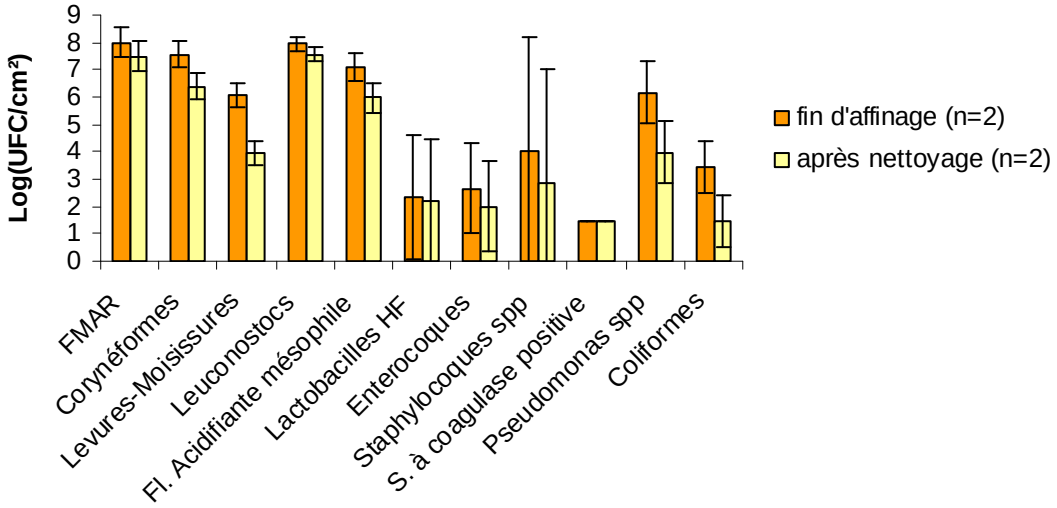


Figure II.10. Effet du nettoyage sur les dénombrements de la FMAR et de 10 groupes microbiens présents sur les planches d'affinage (Log(UFC/cm²)). Les barres d'erreur indiquent les intervalles de confiance ($P < 0,05$). FMAR : Flore Mésophile Aérobie Revivifiable. Fl. : Flore. S. : Staphylocoques. HF : Hétérofermentaire Facultatif. Le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive est inférieur à 1,48 Log(UFC/cm²).

Cette comparaison peut aussi être interprétée comme l'évolution des populations microbiennes entre le début et la fin de l'affinage des fromages sur les planches. En l'absence de dénombrement à la surface du fromage, deux hypothèses au sujet de la dynamique microbienne entre la planche et le fromage peuvent être émises : (i) le transfert probable des *Geotrichum candidum* du fromage à la planche, (ii) le développement plus important de cette espèce à la surface de la planche. Ce raisonnement peut aussi s'appliquer aux autres flores dénombrées.

3.3 Comparaison des profils des consortia microbiens obtenu par la technique SSCP de planches aux stades fin d'affinage et après nettoyage

Des analyses SSCP ont aussi été réalisées pour mettre en évidence au sein des consortia des flores non recherchées par dénombrement sur les géloses sélectives. Elles avaient aussi pour objectif de comparer les profils des consortia aux stades fin d'affinage et après nettoyage pour une même origine de fromage. Elles ont été réalisées sur 4 consortia décrochés au printemps, par brossage sur 4 planches d'âges variables après l'affinage de fromages de l'origine C et cryoconservés (6 semaines à -20°C). Deux planches étaient au stade fin d'affinage (ou avant nettoyage) et 2 planches au stade après nettoyage. Ces 2 stades ne correspondaient pas au même lot de fromages mais les planches ont été récoltées le même jour.

Les profils des consortia des 4 échantillons après amplification des régions V2, V3 de l'ARN 16S pour les bactéries et de la région V4 de l'ARN 18S pour les levures sont représentés sur les Figures II.11 et II.12.

Pour les Figures II.11 a et b, une similarité des profils SSCP entre les planches pour un même stade et entre les stades peut être notée. Cette similarité traduit un équilibre entre les flores au sein des consortia équivalents entre 2 planches d'un même lot de fromage et une absence de modification de cet équilibre au cours du nettoyage. En effet, les différences de fluorescence entre les profils fin d'affinage et après nettoyage ne sont pas significatives. Il n'y a donc pas eu d'apparition ni de disparition de flores détectées par cette technique entre les 2 stades de prélèvement. La comparaison des profils obtenus sur la Figure II.11 avec des profils de référence, dont les pics sont identifiés (Duthoit *et al*., 2003), indique la présence de bactéries à Gram positif et catalase positive (bactéries corynéformes et/ou staphylocoques) et de bactéries à Gram négatif (*Enterobacteriaceae* et /ou *Pseudomonaceae*).

Sur la Figure II.12, un seul pic est retrouvé sur les 2 profils de fin d'affinage, ce qui est en faveur de la prédominance d'une levure au sein de ces consortia, probablement des *Geotrichum candidum.* Ce pic diminue fortement après nettoyage, ce qui peut être relié, grâce au traitement identique de tous les échantillons (même condition d'extraction, absence de dilution) à une réduction de la population de cette flore au cours du nettoyage.

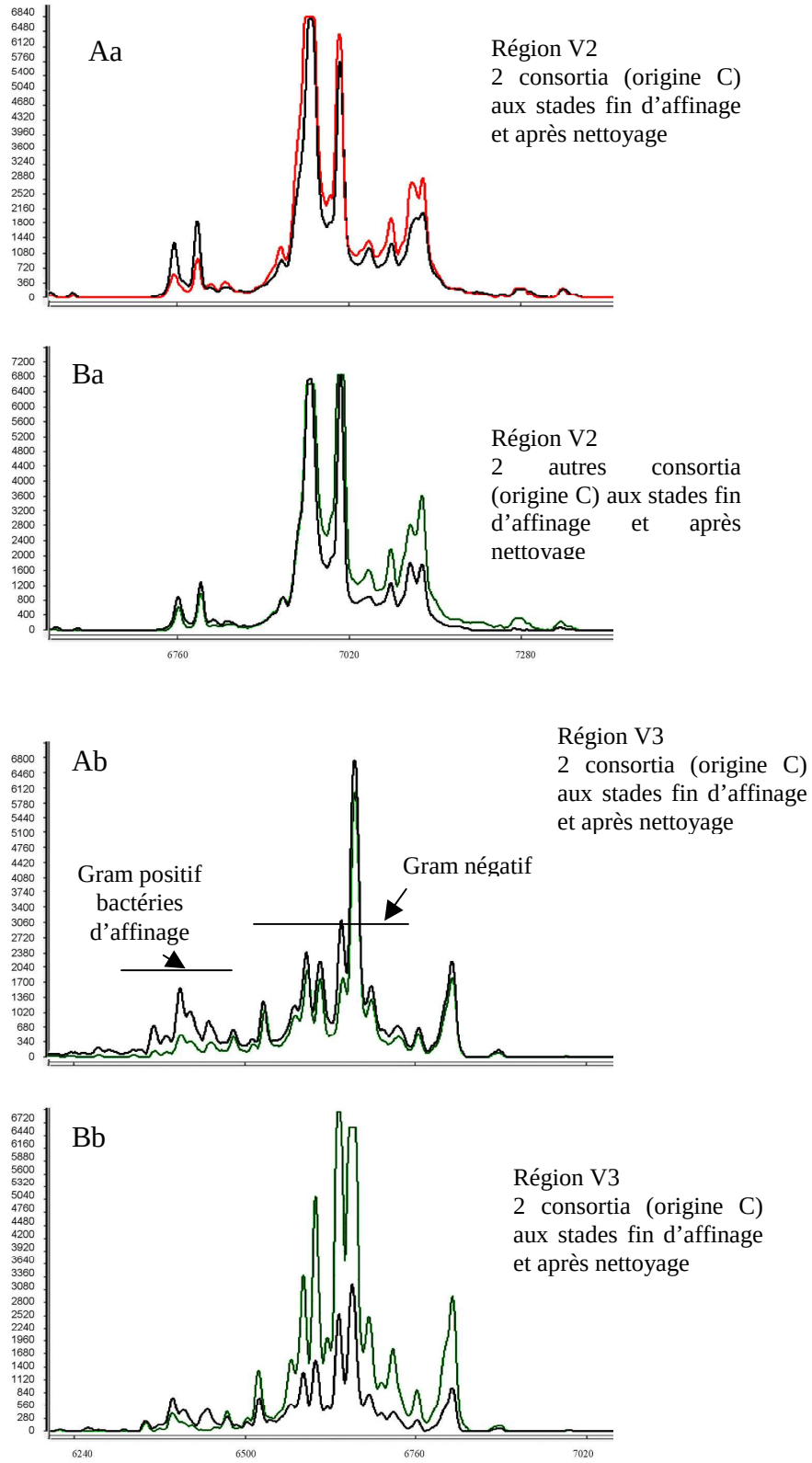


Figure II.11. Comparaison des profils SSCP obtenus après amplification par PCR des régions V2 (a) et V3 (b) de l'ARN 16S des bactéries des 4 consortia (Origine C). A. 2 consortia aux stades fin d'affinage (noir) et après nettoyage (vert ou rouge). B. 2 autres consortia aux stades fin d'affinage (noir) et après nettoyage (vert). Ordonnée, fluorescence ; abscisse, élution en scans (unité du logiciel GeneScan).

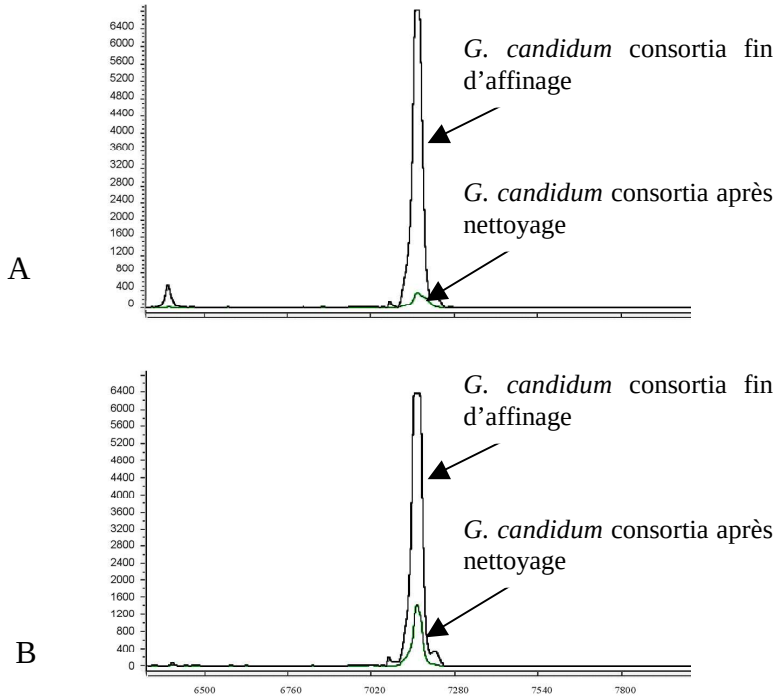


Figure II.12. Comparaison des profils SSCP obtenus après amplification par PCR de la région V4 de l'ARN 18S des levures des 4 consortia (Origine C). A. 2 consortia aux stades fin d'affinage (noir) et après nettoyage (vert ou rouge). B. 2 autres consortia aux stades fin d'affinage (noir) et après nettoyage (vert). Ordonnée, fluorescence ; abscisse, élution en scans (unité du logiciel GeneScan).

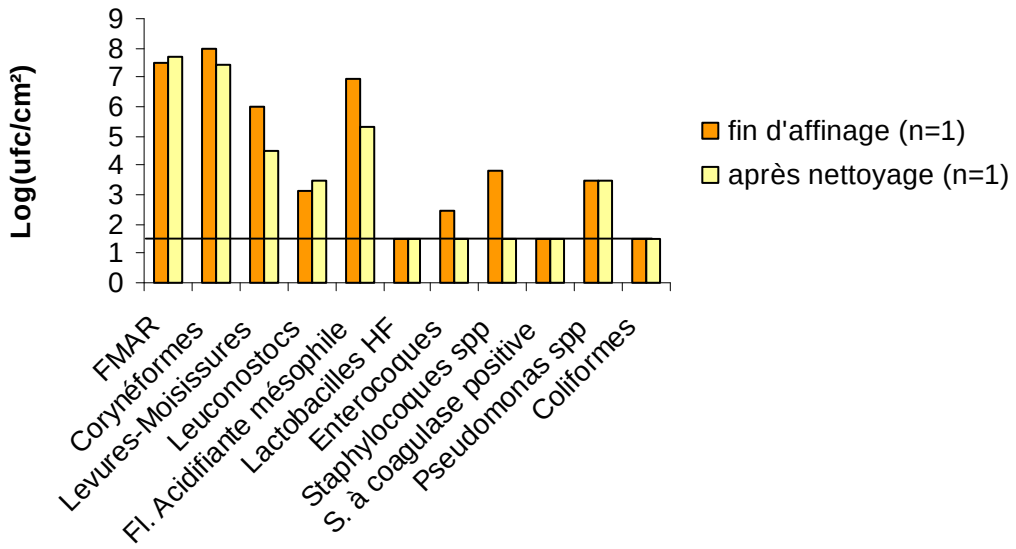


Figure II.13. Comparaison des dénombrements de la FMAR et de 10 flores de 2 consortia de fin d'affinage et après nettoyage, origine C, analysés par SSCP (Log(UFC/cm²)). FMAR : Flore Mésophile Aérobie Revivifiable. Fl. : Flore. S.: Staphylocoques. HF : Hétérofermentaire Facultatif. La ligne correspond au seuil de détection pour toutes les flores (1,48 Log(UFC/cm²)), sauf pour les *Pseudomonas* spp et les leuconostocs pour le stade après nettoyage (3,48 Log(UFC/cm²)).

En comparaison avec les dénombrements de la partie 2.2 et de la Figure II.13, la première remarque concerne la diversité des flores. En effet, 8 pics sont observés dans la région des bactéries à Gram négatif sur la Figure II.11 b, qui peuvent correspondre à des genres ou des espèces différentes. Cette diversité de souches et d'espèces observée par SSCP peut être expliquée par les différentes espèces et souches dénombrées comme coliformes ou par la présence de flores non dénombrées parmi les *Enterobacteriaceae*. Il faut néanmoins garder en mémoire l'amplification par PCR au cours de la préparation des échantillons, qui favorise l'apparition des pics correspondant aux flores dominantes du consortium. Pour les levures, la prédominance d'une seule espèce est confirmée, en l'occurrence des *Geotrichum candidum*. Cependant, il faut noter que le seuil de détection pour les levures est de 10^3 UFC/ml. Pour la comparaison des consortia avant et après nettoyage, ces analyses sont corrélées avec les comparaisons des dénombrements (Figure II.13). Il n'y a pas eu de modification importante des profils sauf une diminution significative des *Geotrichum candidum*.

Pour les bactéries d'affinage, la diversité ne semblait pas très importante parmi les flores détectées en SSCP, puisque 6 pics ont été isolés pour 3 flores d'affinage (bactéries corynéformes et staphylocoques à coagulase négative). Or, une seule origine de fromages a été analysée (C). En effet, d'après la littérature, la diversité des souches notamment des corynébactéries de la croûte est associée à l'origine des fromage (Bärtschi *et al*., 1994 ; Etude SCM, 2002-2004).

La technique d'analyse SSCP a permis de confirmer les faibles modifications de l'équilibre des flores microbiennes entre les stades fin d'affinage et après nettoyage, sauf pour la population des *Geotrichum candidum*. Les différentes comparaisons entre les stades fin d'affinage et après nettoyage (Tableaux II.2 et II.3, Figures II.10 et II.13) indiquent que l'influence du nettoyage peut varier pour certaines flores du consortium (flore acidifiante mésophile, staphylocoques spp, *Pseudomonas* spp, alors que la chute de population des *Geotrichum candidum* est toujours comprise entre 2 et 3 Log(UFC/cm²).

3.4 Comparaison des stades de prélèvements par observation microscopique des biofilms présents sur les planches d'affinage

Les observations au Microscope Electronique à Balayage et au microscope confocal laser à balayage ont été réalisées sur les mêmes planches que les analyses par IRTF au 2 stades fin d'affinage et après nettoyage. Le transport jusqu'au laboratoire de Massy a été réalisé entre 2 planches avec du film alimentaire pendant 24 h à température ambiante. Ces 2 types d'observations complémentaires ont été réalisées pour connaître la disposition et la répartition des micro-organismes au sein d'un biofilm sur un support bois.

4.1 Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

La Figure II.14 présente les images obtenues au microscope électronique à balayage des surfaces des planches d'âge variable, utilisées pour l'affinage des fromages de l'origine C, aux stades fin d'affinage et après nettoyage. Pour le stade fin d'affinage (A à G), des bactéries (cellules de 1 à 2µm) et des levures (> 5µm) sont visibles sur les fibres et dans les anfractuosités et les fissures du bois. Plus les cellules sont petites, principalement les bactéries, plus elles se positionnent dans les anfractuosités. Elles peuvent être isolées ou former des agrégats. Des cellules de *Geotrichum candidum* dont la morphologie est aisément reconnaissable (cylindres de 10µm) sont retrouvées sur toute la surface. Des structures filamenteuses de cette levure qui peuvent être observées le long des fibres du bois, indiquent une multiplication levurienne dans cet environnement. Il est important de noter que le biofilm ne recouvre pas totalement la surface du bois. Cette colonisation hétérogène avait également été notée par observations en MEB de la surface d'une gerle de bois après une semaine de contact journalier avec du lactosérum et 3 jours de fabrication (Richard, 1997). Cette étude avait aussi démontré la présence de bactéries et de levures sur la surface et dans des microfissures. Sur les photos du stade après nettoyage (H à J), ni les bactéries, ni les levures ne sont visibles, ce qui laisse apparaître les structures des fibres du bois, notamment les trachéides et leurs ponctuations (Figure II.14 I). L'absence de levures visibles sur les planches après nettoyage est à mettre en relation avec la chute de population de 2 Log(UFC/cm²) observée pendant le nettoyage. En effet, pour 100 cellules de *Geotrichum candidum* observées sur un champ d'observation au MEB en fin d'affinage, 1 cellule serait visible pour un même champ avec une réduction de 2 Log(UFC/cm²) due au nettoyage.

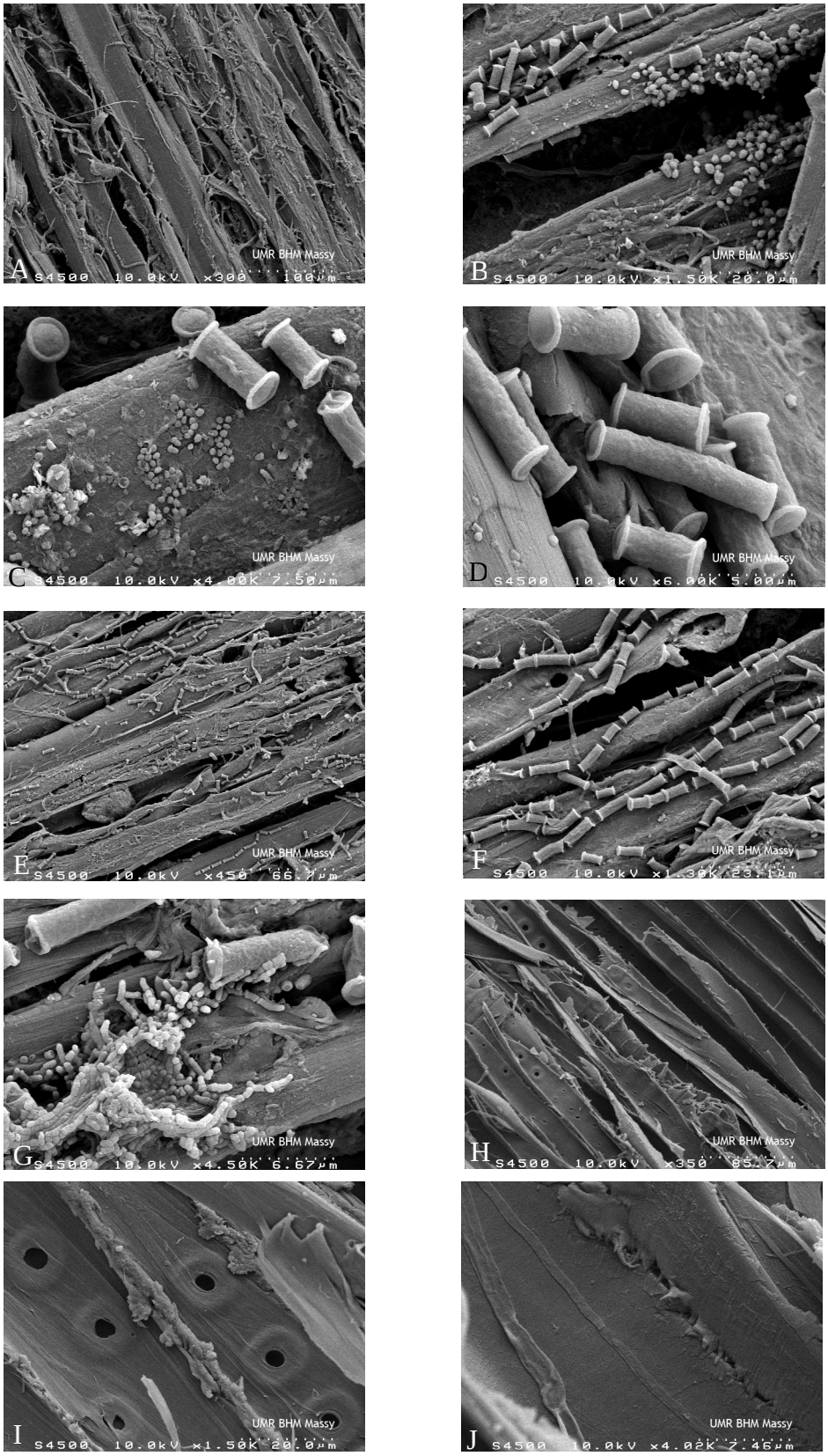


Figure II.14. Surface d'une planche d'affinage de fin d'affinage en Microscopie Electronique à Balayage. Fin d'affinage (A : x300 ; B : x1500 ; C : x4000 ; D : x 6000 ; E : x450 ; F : x1300 ; G : x4500), et après nettoyage (H : x350 ; I : x1500 ; J : x4000). Le biofilm ne recouvre pas la totalité de la surface de la planche. B, D, D et G. Des bactéries sont logées dans les fissures. C, D et G. Détails de *Geotrichum candidum* (cylindres) et bactéries. H, I et J. Absence de *Geotrichum candidum* et de bactéries sur les surfaces observées. Structure des fibres de bois, trachéides (H) et ponctuations aréolées (I) (F. Dubois-Brissonnet, UBHM).

En revanche, l'absence de bactéries sur les photos des planches après la phase de nettoyage, alors que la population totale ne chute que de 0,5 Log(UFC/cm²) sur la Figure II.6 peut être reliée à un artefact dans la préparation des échantillons de planches. En effet, les planches à analyser n'ont pu être récupérées chez l'affineur que 2 jours après le séchage. Cette dessiccation ajoutée au transport, a pu stresser les bactéries et les sensibiliser aux bains alcoolisés réalisés avant le passage au MEB. Les bactéries peuvent aussi être fixées en profondeur, non visibles en microscopie mais récupérables par brossage ou ultra-sons. Dans l'étude de Richard (1997), après un lavage à l'aide d'une lessive alcaline chaude et un rinçage à l'eau froide, les bactéries et levures n'étaient plus visibles sur les photographies. Les effets du nettoyage sont donc visibles par MEB.

4.2 Imagerie spectrale confocale

La Figure II.15 présente les images obtenues par imagerie spectrale confocale de la surface des mêmes planches d'affinage utilisées pour les observations au MEB (origine C, stades fin d'affinage et après nettoyage). Pour le bois neuf (A et B), les structures des fibres du bois sont visibles, notamment les rayons ligneux (A). Pour le stade fin d'affinage (C et D), tout comme pour les observations au MEB, des bactéries et des levures sont visibles sur les fibres et dans les anfractuosités et les fissures du bois. Des cellules végétatives de *Geotrichum candidum* sont retrouvées sur la surface (C). Sur ces images, le biofilm ne recouvre pas totalement la surface du bois, comme sur les images du MEB. Le mode de préparation des échantillons pour le MEB (déshydratation dans des bains alcoolisés) n'a donc pas modifié la structure du biofilm du stade fin d'affinage.

Sur les photos du stade après nettoyage (E et F), des bactéries et des levures sont encore visibles à la surface et dans les anfractuosités des planches. Ces micro-organismes apparaissent moins nombreux que pour le stade fin d'affinage, ce qui correspondrait à la chute d'1 Log(UFC/cm²) observée pour la FMAR pendant la phase de nettoyage. Par rapport aux images du MEB où ni les bactéries ni les levures n'étaient visibles, l'absence de déshydratation pour la préparation des échantillons a pu minimiser le stress lié au transport, et permettre l'observation des micro-organismes.

Les bactéries et les levures sur les planches d'affinage colonisent la surface et les anfractuosités des planches d'affinage. Sur la surface, cette colonisation est hétérogène à l'échelle microscopique, avec des zones de bois sans bactéries.

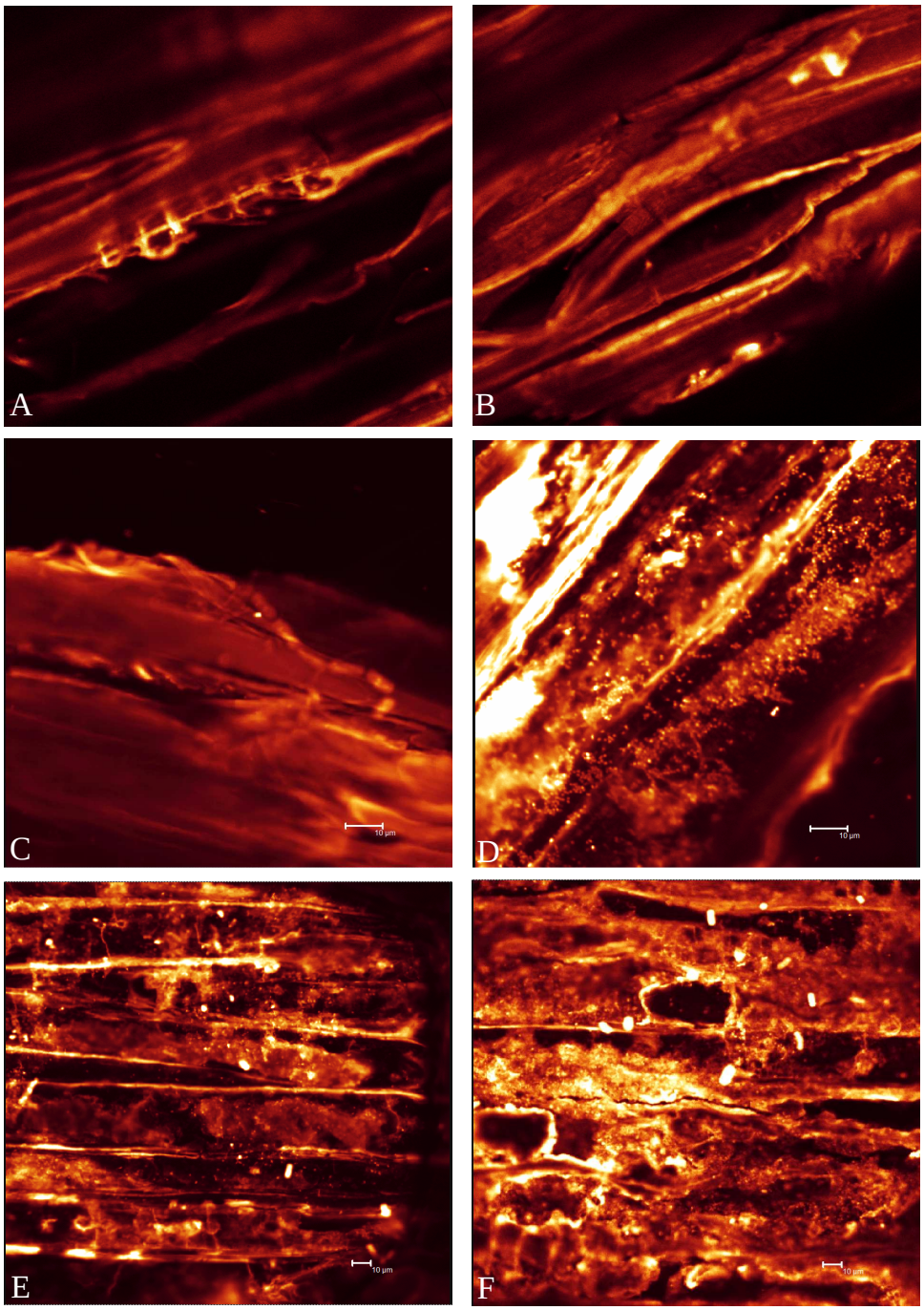


Figure II.15. Surface d'une planche d'affinage par Imagerie Spectrale Confocale. Bois neuf (A, B). Fin d'affinage (C, D). Après nettoyage (E, F). C. Détails de *Geotrichum candidum* (cylindres). (R. Briandet, UBHM)

Les éléments importants de l'étude de l'écologie microbienne du stade fin d'affinage sont (i) la prédominance de la flore d'intérêt technologique de surface du reblochon et les faibles dénombrements des flores indésirables sur les planches, (ii) la relation entre les flores à la surface du fromage et la surface des planches, (iii) l'absence d'influence de l'âge de la planche sur ces flores ainsi que l'absence d'influence de l'origine des fromages et de la saison sur les flores majoritaires. Ce dernier point est à relier avec les pratiques strictes et spécifiques de l'affineur. (iv) l'homogénéité microbienne du biofilm au sein d'une empreinte et d'une planche. (v) les conditions du biotope de la surface des planches (pH, a_w et taux de NaCl) favorables au développement microbien au stade fin d'affinage. Les opérations de nettoyage, comprenant un brossage mécanisé à l'eau froide et un séchage affectent peu la FMAR, mais entraînent une chute des populations de certaines flores, notamment les *Geotrichum candidum*. Les conditions du biotope des planches au stade après nettoyage (principalement l'a_w) ne sont pas favorables à la croissance bactérienne sauf pour les flores halophiles.

IV Conclusion

Pour les planches au stade fin d'affinage, les principaux points à retenir de cette partie des travaux sont la prédominance de la flore d'intérêt technologique de surface du reblochon et les faibles dénombrements des flores indésirables sur les planches ainsi que l'homogénéité des flores majoritaires par rapport à l'origine des fromages, l'âge des planches et la saison. Ces 3 points sont à mettre en relation avec la technique d'affinage mise en place par l'affineur. En effet, celle-ci est très stricte et concerne les relations entre les planches et les fromages, le lavage des fromages et le brossage-séchage des planches. Ce profil microbien composé en majorité de flores d'intérêt technologique a aussi été retrouvé après seulement 6 mois d'utilisation des planches en cave. Il apparaît aussi très stable de 6 mois jusqu'à 14 ans d'utilisation. Cette stabilité des flores d'intérêt technologique est surtout remarquable pour les dénombrements de levures et moisissures au stade fin d'affinage qui tout au long de l'étude sur 3 ans ont toujours été compris entre 5,71 et 6,26 Log(UFC/cm²). Une autre caractéristique des planches en fin d'affinage mise en évidence est l'homogénéité des dénombrements des flores majoritaires à la surface d'une même planche. En contre partie, à l'échelle microscopique, la répartition des micro-organismes du biofilm présent à la surface des planches est hétérogène.

Toujours sur des planches en fin d'affinage, les dénombrements des flores minoritaires n'ont pas été influencés par l'âge des planches, mais ces dénombrements pouvaient varier en fonction de l'origine des fromages. Les paramètres physico-chimiques de la surface des planches (pH, a_w et taux de NaCl) n'étaient pas influencés non plus par l'âge des planches mais par l'origine des fromages pour le pH et l'a_w. Ces conditions environnementales étaient néanmoins favorables à la croissance bactérienne. En plus de la similarité des flores dominantes entre la surface des planches et la croûte du reblochon, la proximité des compositions moléculaires du biofilm « fin d'affinage » et de la croûte de reblochon a aussi été démontré. Cependant, la matière organique présente à la surface des planches d'affinage était présente en faible quantité.

Dans ce chapitre, l'influence du nettoyage a aussi été étudié par comparaison de 2 stades : fin d'affinage, ou avant nettoyage, et après nettoyage-séchage. Microbiologiquement, l'influence du nettoyage est surtout visible sur les populations des *Geotrichum candidum* et de *Pseudomonas* spp, influence confirmée par la SSCP et le MEB pour les premiers. L'humidité et l'a_w des planches étaient aussi fortement influencées par le séchage. Ainsi, l'a_w au stade après nettoyage n'était pas favorable à la croissance bactérienne à l'exception de la flore halophile La spectroscopie infra-rouge a aussi révélé la diminution des quantités des principales familles biochimiques à la surface des planches après les opérations de brossage-séchage.

Article accepté le 24 Novembre 2006 à Journal of Dairy science

J. Dairy Sci. 90:1653–1661
doi:10.3168/jds.2006-190
© American Dairy Science Association, 2007.

Biofilm Ecology of Wooden Shelves Used in Ripening the French Raw Milk Smear Cheese Reblochon de Savoie

C. Mariani,*†‡ R. Briandet,† J.-F. Chamba,‡ E. Notz,‡ A. Carnet-Pantiez,* R. N. Eyoug,* and N. Oulahal*[1]
*Université Claude Bernard Lyon 1, Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire, EA 3733, IUT A Département Génie Biologique, Bourg en Bresse, F-01060 France
†Unité Mixte de Recherche 763-UBHM, Institut National de la Recherche Agronomique et Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires, Massy, F-91744 France
‡Institut Technique Français des Fromages, La Roche sur Foron, F-74801 France

ABSTRACT

Little work has been carried out on the microbiology of wooden shelves supporting cheese during ripening, and the safety of their use during cheese ripening has frequently been asked. Microbial characterization (enumerations on specific growth media) and description of their physicochemical conditions (pH, water activity, and salt concentration) were determined on 50 wooden shelves of 3 different ages at the end of the cheese-ripening process, using cheeses from 8 farm producers. The experiments were performed during 2 different seasons (summer and autumn). Micrococci-corynebacteria and yeasts and molds were found to be the dominant microflora on the shelves. Leuconostocs, facultative heterofermentative lactobacilli, enterococci, staphylococci, and pseudomonads were also found but at lower levels. There was no statistical difference in the major microflora between shelves of different ages. Moreover, the total counts and the predominant microflora showed a surprising homogeneity between origins of cheeses. For most of the microflora enumerated, no seasonal variation was observed. Regardless of the age of the shelves, the wood had high water activity values (0.94 to 0.97), neutral pH values (7.1 to 8.3), and low salt contents (0.11 to 0.17 mg/cm^2). The origins of the cheese had a statistically significant impact on water activity, pH, and salt concentration, whereas the age of the shelves did not influence these parameters. This study demonstrated the stability of the technological biofilm present on wooden shelves and will serve to enlarge the debate on the use of wood in cheese ripening.
Key words: wooden shelf, biofilm, ecology, ripening

INTRODUCTION

Wood has a long tradition as a natural material used in food production. Today, some traditional foods; for example, cheeses and alcoholic beverages, are still produced in contact with this natural material (for maturation or packaging purposes). The amount of cheese ripened on wood is estimated to be greater than 350,000 tonnes per year in France, especially in Registered Designation of Origin productions. Most cheese manufacturers believe that wooden shelves favor cheese rind development and improve the organoleptic qualities and typicality of cheeses. Moreover, such shelves offer excellent mechanical resistance. However, the presence of water and nutrients as well as the porosity of this material may favor microbial development and limit the efficiency of the cleaning procedure. As far as regulations are concerned, wood can be used in the ripening of traditional cheeses under a European derogation law (decision 96/536/CE of July 29, 1996). Very few studies have focused on the interactions between wood and microorganisms and on the hygienic status of wood in food plants. In addition, the few existing reports are contradictory as synthesized by Carpentier (1997). Gehrig et al. (2000) indicated that in dry environments wooden surfaces were not less hygienic than polyethylene surfaces. Moreover, no growth of bacteria was observed 24 h after depositing 2.4×10^2 cells of *Escherichia coli* on a dry, poplar wooden crate, whereas bacterial development occurred on a glass surface under the same conditions (Revol-Junelles et al., 2005). Some recommendations for safe use of wood in food processing have been suggested by several authors: dry storage, careful handling, selection of wood species (pine, oak; Prechter et al., 2002; Schönwälder et al., 2002; Milling et al., 2005). Other studies have reported that inert polymers were consistently more hygienic than wooden surfaces that allowed bacterial retention after food service washing (Welker et al., 1997). The potential for cross-contamination has also been demonstrated for wooden and polymeric chopping boards with significant increased persistence of bacteria on wood (Gough and Dodd, 1998). The microbial characterization of a biofilm present on wood was first described in the study of

Received March 31, 2006.
Accepted November 24, 2006.
[1]Corresponding author: oulahal@iutbourg.univ-lyon1.fr

Swaffield et al. (1997), where bacteria (lactic and acetic acid bacteria) and yeasts were isolated from cider fermentation vats. Within 2 wk, microorganisms penetrated into the porous material to a depth of 1.2 cm. The influence of these stable biofilms on the organoleptic profiles of ciders has also been demonstrated. In cheese technology, the microbial ecosystems have classically been analyzed by enumeration on selective media and more recently by biomolecular techniques (Duthoit et al., 2003; Ogier et al., 2004) or Fourier-transform infrared microspectroscopy (Wenning et al., 2006). Influence of the milk origin (cow or goat; Bockelmann and Hoppe-Seyler, 2001), production under farmhouse or industrial cheese (Feurer et al., 2004), and the anti-*Listeria* potential (Maoz et al., 2003) of cheese surface ecosystem have been compared. To our knowledge, there has been no publication on the microbial profile of the wooden shelves used in cheese ripening. One publication has described microbial development on wood by direct observation after 1 wk of daily contact with whey and 3 d of cheese production (Richard, 1997). Therefore, there is a clear need for systematic investigation of the microbiological ecosystems on wooden shelves during ripening and to assess the hygienic status of this traditional material. The aim of the present study was to describe the natural biofilms on wooden shelves used for the ripening of Registered Designation of Origin Reblochon de Savoie. The enumeration of the main bacteria and yeasts was determined on wooden shelves used in ripening cheese of different origins on selective agar. The physicochemical properties [pH, water activity (a_w), and salt concentration] of the wood were also determined. These data will serve to help in the debate of the use of wood in cheese ripening.

MATERIALS AND METHODS

Cheesemaking and Ripening Process

Reblochon de Savoie is a raw milk smear cheese produced in the French Alps. The first step of cheesemaking consists of an inoculation of the milk with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. Occasionally, *Lactococcus lactis* and *Geotrichum candidum* (rarely) will be used. Then, 30 min after calf rennet addition, the curd is cut and gently stirred to eliminate whey. The curd is molded and gently pressed for few hours, then salted in brine for 2 h. The first part of the ripening takes place on the producer's farm at 17°C with 95% relative humidity before the cheeses are bought by a traditional ripener who finishes the ripening on wooden shelves for 2 wk. Cheeses are usually smeared (washed with a salted solution) twice: by the cheesemaker and by the ripener.

The traditional ripener in the present study bought cheeses from 20 different farms, 7 d after their manufacture. Cheeses were laid on wooden shelves, chosen at random after a brush with cold water and an air-dry, during a 2-stage ripening, occurring in 2 ripening rooms. In the first one (13°C and 95% relative humidity), cheeses were smeared once, and the shelves holding the cheeses were changed daily. In the second ripening room (14°C and 95% relative humidity), the shelves were not changed daily and were in contact with the same cheeses for 5 to 9 d, without smearing. The shelves were cut lengthwise from spruce wood (*Picea abies*) and had been used in cheese ripening from 6 mo to 14 yr. Their visual aspects differed according to their age, becoming darker and smoother through use. Each shelf had 14 marks on each side corresponding to the contact zones of the cheeses and were more visible on the older shelves. These points led us to choose the end of the ripening time in the second ripening room to describe the biofilm ecology because at this stage the biofilm was most representative on shelves.

For transport to the laboratory for experiments (2 h), the shelves analyzed in the autumn were wrapped in 2 layers of clingfilm, and placed between 2 shelves with the same humidity rate in a thermal insulated box. During the summer study, the shelves could not be transported, and the original biofilm removal was achieved in the ripening rooms.

Factors Studied

The ripening process described above led to testing 2 variables: the age of shelves (time between first use and the experiment) and the origin of cheeses put on the shelves (the farmhouses on which the cheeses were made). A total of 50 shelves were analyzed, 10 during the summer and 40 in the autumn. Three ages of shelves were tested for shelves: less than 4 yr old (young), from 5 to 8 yr old (medium), and more than 8 yr old (old) for the autumn study, but only young and old shelves were analyzed in the summer. Cheeses from 8 farmhouses origins were tested, each of which resulted usually in cheeses with different organoleptic features (farmhouses A to H) for the autumn experiments and 5 farmhouse origins (A to E) for the summer ones. To assess the interaction between these factors, in autumn, 40 shelves were analyzed [8 origins × 5 shelves (2 young, 1 medium, 2 old)].

To analyze the influence of the season, only cheeses from farmhouses A to E and the youngest and oldest shelves were compared. This comparison was based on 35 shelves: 10 shelves for the summer study [5 origins × 2 shelves (1 young, 1 old)] and 25 shelves for the

main autumnal study [5 origins × 5 shelves (2 young, 1 medium, 2 old)].

Physicochemical Characterization of Wooden Shelves

For each shelf, pH, water activity ($\mathbf{a_w}$), and salt concentration were analyzed on 3 separate marks (40 results obtained on 40 shelves). To analyze pH, one drop of distilled water was placed on the mark. After 10 min at 20°C, a color-coded strip (Neutralit pH5-10, Merck, Darmstadt, Germany) was placed in the water on the shelf, and the pH was recorded. Preliminary experiments on wooden shelves showed good agreements between pH values determined by this strip technique and direct measurement of pH with a surface electrode. For a_w determination, each value was a mean of 3 measurements performed with a dew point instrument (FAst/1, GBX Scientific Instruments, Romans sur Isere, France). The salt concentration was determined on sawdust obtained by sandpapering a cheese mark to a depth of 1 mm. The sawdust (1 g) was mixed with 50 mL of distilled water and decanted for 1 h at room temperature, after which chloride ions in the liquid were analyzed with a chloride-meter (No. 926, Corning International, New York, NY).

Removal of Biofilm by Ultrasound

In the autumn study, biofilms were removed from 2 cheese contact points on each shelf (80 results) in the laboratory, whereas removal was made on one mark (10 results) in the ripening rooms for the summer study. A portable sonicator (Branson Ultrasonics, Annemasse, France) with a fundamental resonant frequency of ~40 kHz was used as described previously (Oulahal-Lagsir et al., 2003). Briefly, ultrasound waves were applied for 10 s in an active chamber filled with 15 mL of sterile one-quarter strength Ringer's solution (Biokar, Beauvais, France) directly on 10 cm^2 of wood biofilm. The solution was then homogenized and put in a sterile flask. After a storage at 4°C for 24 h for the summer study and immediately after the removal for the autumn study, the microbial suspension obtained was mixed (vol/vol) with a sterile milk solution (110 g/L, Prolait, Eurial Poitouraine, Jaunay Clan, France) supplemented with 10% (wt/vol) glycerol (Sigma, St. Louis, MO) before freezing at −80°C (Chamba et al., 2005).

Microbial Enumerations of Suspended Biofilms

The frozen samples of suspended biofilms were thawed at 20°C for 20 min, after a maximum 6 mo frozen storage at −80°C and were directly plated in duplicate on the surface of different media using a spiral plater (Interscience, Saint Nom La Breteche, France) directly from the cryoconserved suspension or after 10-fold dilutions in one-quarter strength Ringer's solution. All media were purchased from Biokar, except *Pseudomonas aeromonas* selective agar, which was purchased from Merck. All the antibiotics were purchased from Sigma, except amphotericin B and penicillin G, which were from Calbiochem (Fontenay-sous-Bois, France).

The total microbial population was enumerated on plate count agar after 7 d at 20°C.

Enumeration of micrococci and corynebacteria was performed on micrococci-corynebacteria medium (in-house formulation, ITFF-Aérial), which contained in 1 L: 15 g of tryptone (Difco, Le Pont-De-Claix, France), 5 g of soy peptone (Difco), 6 g of yeast extract (Difco), 20 mL of sodium lactate (60% solution wt/wt; Merck), 2.5 g of dipotassium phosphate (Merck), 40 g of sodium chloride (Merck), 15 g of bacteriological agar (Biokar). After sterilization and cooling to 45°C, furazolidone (10 mg/L), nalidixic acid (40 mg/L), and amphotericin B (80 mg/L) were added. Agar plates were incubated for 5 d at 20°C.

Yeasts and molds were enumerated using chloramphenicol glucose agar after 5 d at 20°C.

To enumerate presumptive staphylococci, cheese ripening bacteria medium (Denis et al., 2001) was used supplemented with bacitracin (30 mg/L), nalidixic acid (40 mg/L), and amphotericin B (80 mg/L). Agar plates were incubated for 5 d at 20°C in an anaerobic atmosphere, without an enrichment in CO_2. The coagulase test was not performed.

Pseudomonads were enumerated on *Pseudomonas aeromonas* selective agar to which penicillin G (57.8 mg/L) and amphotericin B (80 mg/L) were added after incubation for 3 d at 20°C.

Enterococci were enumerated on bile esculin azide agar after 2 d incubation at 37°C.

To assess leuconostocs, the Nickels and Leesment medium (Nickels and Leesment, 1964) was used with the addition of vancomycin (170 mg/L) and amphotericin B (80 mg/L). Agar plates were incubated for 5 d at 20°C.

For the facultatively heterofermentative lactobacilli population, the facultatively heterofermentative medium of Isolini et al. (1990) was used with incubation for 3 d at 37°C in an anaerobic atmosphere, without an enrichment in CO_2.

Coliforms were enumerated on violet red bile lactose after 24 h at 30°C.

Scanning Electron Microscopy of Wooden Shelves

Wooden samples were fixed for 1 h in a glutaraldehyde solution (3% vol/vol), rinsed 3 times for 10 min in

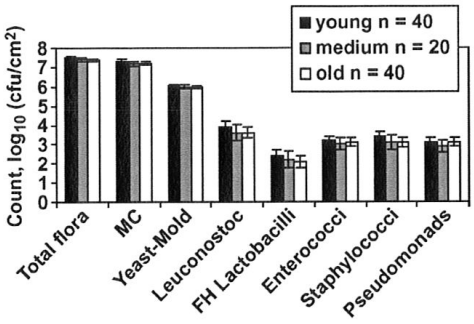


Figure 1. Effect of age of wooden shelf on the means of the counts of different groups of microorganisms on wooden shelves ($\log_{10}$(cfu/cm^2). Error bars indicate confidence interval ($P < 0.05$). Young = less than 4 yr old; medium = from 5 to 8 yr old; old = more than 8 yr old. MC = micrococci-corynebacteria; FH = facultatively heterofermentative.

a sodium cacodylate solution (0.2 *M*, pH = 7.4), dehydrated in a succession of 12 alcohol baths of increasing alcohol concentrations (increase of 3% between each bath, from 70 to 100% vol/vol), and coated with gold in a cathode vacuum evaporator (Jeol JFC 1102, Tokyo, Japan). Observations of samples were made using a Hitachi S-4500 scanning electron microscope (Ibaraki, Japan), at an accelerating voltage of 10 kV.

Statistical Analysis

All counts were expressed as $\log_{10}$(cfu/cm^2). To evaluate the influence of time, origin of cheese, and age of shelves on the microbial levels, and physicochemical values, an ANOVA was performed with Splus 2000 (Mathsoft, Seattle, WA). The principal effects and interactions were estimated using ANOVA variance analysis (type III sum of squares for unbalanced groups) and mean comparison (Bonferroni test, with a significant level of $P < 0.05$).

RESULTS

Influence of Age of Shelf, Origin of Cheese, and Season on Microbial Flora of Wood Biofilms

In the main statistical analysis of the 40 shelves, standard errors were based on 95 degrees of freedom, and there was no interaction between age and origin for microbial numbers or physicochemical values. Figure 1 summarizes the microbial counts of the spoiling flora (at the origin of deterioration of cheese), the lactic acid flora and the micrococci-corynebacteria, and yeasts and molds, both of which compose the major surface flora of technological interest (at the origin of the typicality of rinds; $\log_{10}$cfu/cm^2) according to the age of the wooden shelves. Micrococci-corynebacteria [7.2 to 7.3 $\log_{10}$(cfu/cm^2)], and yeasts and molds [6.0 to 6.1 $\log_{10}$(cfu/cm^2)] were found to be the dominant microflora on the shelves. Among the yeasts and molds, *Geotrichum candidum* was the most common species. Leuconostocs [3.7 $\log_{10}$(cfu/cm^2)], facultative heterofermentative lactobacilli [2.2 $\log_{10}$(cfu/cm^2)], and enterococci [3.1 $\log_{10}$(cfu/cm^2)], to some extent, were found at much lower levels on the wooden shelves. Staphylococci [3.2 $\log_{10}$(cfu/cm^2)] and pseudomonads [3.0 $\log_{10}$(cfu/cm^2)] were enumerated on 80 samples. There was no statistical difference in any microflora between shelves of different ages ($P < 0.05$).

Table 1 and Figure 2 show the levels of the different groups of microorganisms on wooden shelves according to origins of cheese (A to H). The total count and the predominant microflora (micrococci-corynebacteria and yeast-molds) showed a surprising homogeneity between

Table 1. Comparison of the total counts and the counts of different groups of microorganisms on wooden shelves ($\log_{10}$(cfu/cm^2) according to the farmhouse origin where cheeses were ripened (mean ± SEM; n = 80)

	Leuconostoc	Facultatively heterofermentative lactobacilli	Enterococci	Staphylococci	Pseudomonads
Farm origin	***	***	***	***	***
A (n = 10)	4.3 ± 0.27^{a}	2.4 ± 0.29^{ab}	3.2 ± 0.21^{b}	2.9 ± 0.25^{b}	0.9 ± 0.20^{d}
B (n = 10)	4.5 ± 0.27^{a}	1.4 ± 0.29^{b}	4.0 ± 0.21^{ab}	4.8 ± 0.25^{a}	4.8 ± 0.20^{a}
C (n = 10)	2.8 ± 0.27^{b}	1.4 ± 0.29^{b}	2.2 ± 0.21^{c}	2.1 ± 0.25^{b}	2.5 ± 0.20^{c}
D (n = 10)	3.2 ± 0.27^{b}	2.1 ± 0.29^{b}	3.3 ± 0.21^{b}	3.1 ± 0.25^{b}	3.6 ± 0.20^{b}
E (n = 10)	3.6 ± 0.27^{ab}	2.0 ± 0.29^{b}	2.6 ± 0.21^{c}	3.0 ± 0.25^{b}	3.5 ± 0.20^{b}
F (n = 10)	4.6 ± 0.27^{a}	3.8 ± 0.29^{a}	4.3 ± 0.21^{a}	3.9 ± 0.25^{a}	4.4 ± 0.20^{a}
G (n = 10)	3.2 ± 0.27^{b}	2.0 ± 0.29^{b}	2.2 ± 0.21^{c}	2.8 ± 0.25^{b}	2.5 ± 0.20^{c}
H (n = 10)	3.4 ± 0.27^{b}	2.8 ± 0.29^{ab}	3.1 ± 0.21^{bc}	3.0 ± 0.25^{b}	1.5 ± 0.20^{d}

$^{a–d}$Means within a row with different superscripts differ.

***$P < 0.001$.

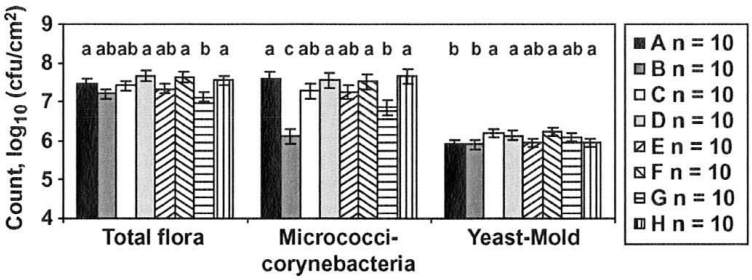


Figure 2. Effect of the cheese producing farmhouses (A to H) on the means of the total bacterial counts, the micrococci-corynebacteria, and the yeast-mould on wooden shelves ($\log_{10}$(cfu/cm^2). Error bars indicate confidence interval ($P < 0.05$). [a–c]Letters correspond to statistically different groups.

these 8 origins of cheeses. The greatest differences for the total count, the micrococci and corynebacteria (excluding cheese B), and the yeasts and molds were 0.56, 0.81, and 0.33 $\log_{10}$(cfu/cm^2), respectively. The B origin of cheese had a count of micrococci and corynebacteria ~1 to 1.5 $\log_{10}$(cfu/cm^2) lower compared with the other cheeses.

To assess the seasonal influence and stability of the shelf microbiological profiles, the autumn and summer results were compared (Figure 3). For most of the microbial groups enumerated, no seasonal variability was observed ($P < 0.05$), but statistical differences were found for staphylococcal and pseudomonads populations. For these 2 groups, levels increased by 1.0 $\log_{10}$(cfu/cm^2) for the staphylococci and 1.4 $\log_{10}$(cfu/cm^2) for the pseudomonads from summer to autumn (respectively $P < 0.001$ and $P = 0.029$, standard errors based on 50 degrees of freedom). Some differences were observed among cheeses of different origins: shelves in contact with B cheese origin showed a significant decrease in total microflora [0.72 $\log_{10}$(cfu/cm^2); $P < 0.001$], in micrococci and corynebacteria levels [1.23 $\log_{10}$(cfu/cm^2); $P < 0.001$; data not shown). Shelves in contact with cheese A exhibited a significant decrease ($P = 0.005$) of the pseudomonad level [1.0 $\log_{10}$(cfu/cm^2); data not shown]. Figure 3 also clearly shows that confidence intervals were smaller for the total and main microflora than for the others. In addition, coliforms were also enumerated in the summer, and all enumerations were below 2.2 $\log_{10}$(cfu/cm^2) and most under 0.3 $\log_{10}$(cfu/cm^2).

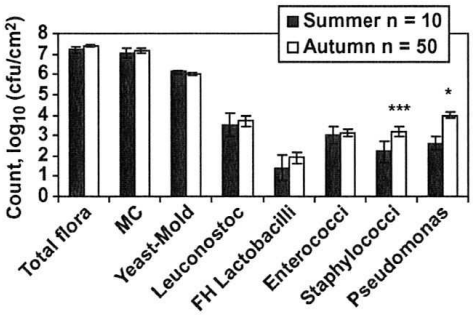


Figure 3. Effect of season on the means of the total bacterial counts and the 7 different groups of microorganisms on wooden shelves ($\log_{10}$(cfu/cm^2). Error bars indicate confidence interval ($P < 0.05$). Summer: samples collected from June to July. Autumn: samples collected from October to November. MC = micrococci-corynebacteria; FH = facultatively heterofermentative. ***$P < 0.001$; *$P < 0.05$.

Scanning Electron Microscopy Observations of Shelf Biofilms

Figure 4 presents the scanning electron microscopy of the shelf biofilms at the end of the ripening (C origin, medium aged shelf). From these micrographs, it is obvious that the nutrients in the wooden ripening shelves promote microbiological growth because bacteria (1 to 2 μm cells) and yeasts (>5 μm) were visible on wood fibers at high levels, mostly in cracks, apertures, and pores of wood. The smaller the cells were (bacteria), the more they colonized the cracks and small cavities of wood. Identifiable morphology of vegetative *Geotrichum candidum* cells (cylinders of around 10 μm) could be seen throughout the sample. Filamentous structures of those technologically important cells could be seen along the wood fibers, indicating a constricted yeast multiplication in that environment. However, the microbial biofilm did not cover all the surface of the shelf.

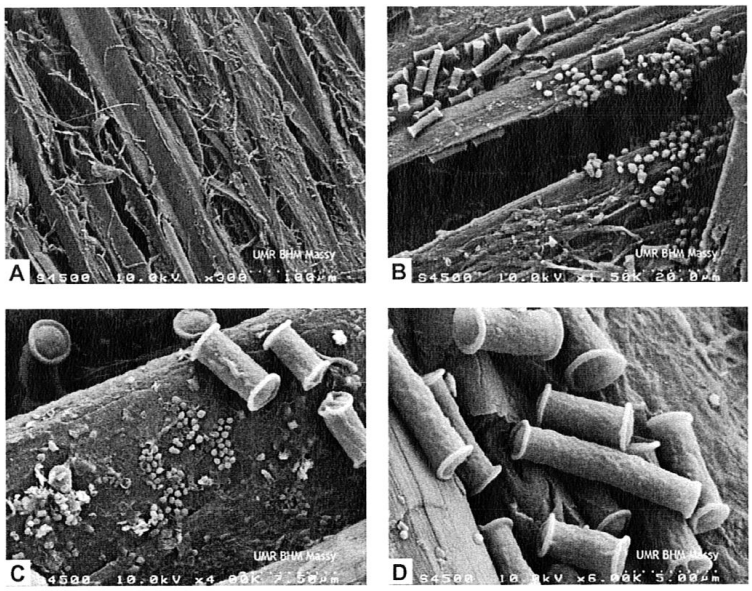


Figure 4. Scanning electron microscopy of the surface of a ripening shelf. A (×300), ripening biofilm does not cover all the surface of the shelf. B (×1,500), bacteria are located in the cracks. C (×4,000) and D (×6,000), details of *Geotrichum candidum* (cylinders) and bacteria.

pH, a_w, and Salt Concentration of the Shelves

Table 2 summarizes the physicochemical characteristics of the shelves of different ages (young, medium, old) and cheese origins (A to H). Regardless of the shelves, the wood had high a_w values (in the range 0.942 to 0.971), neutral pH values (7.1 to 8.3), and low salt contents (0.11 to 0.17 mg/cm^2). The cheese origin had

Table 2. Comparison of physicochemical values of wooden shelves according to the age of shelves (young, medium, and old) and the farmhouse origin where cheeses were ripened (A to H)

Factors (n = 40)	Water activity	pH	Salt concentration mg/cm^2
Mean ± SE	0.960 ± 0.0004	7.6 ± 0.06	0.14 ± 0.003
Farm origin	***	**	*
A (n = 5)	0.946 ± 0.0012^{d}	8.0 ± 0.17^{a}	0.15 ± 0.010^{ab}
B (n = 5)	0.971 ± 0.0012^{a}	7.6 ± 0.17^{ab}	0.11 ± 0.010^{b}
C (n = 5)	0.957 ± 0.0012^{c}	7.6 ± 0.17^{ab}	0.16 ± 0.010^{ab}
D (n = 5)	0.965 ± 0.0012^{b}	7.1 ± 0.17^{b}	0.13 ± 0.010^{ab}
E (n = 5)	0.969 ± 0.0012^{b}	7.5 ± 0.17^{ab}	0.15 ± 0.010^{ab}
F (n = 5)	0.969 ± 0.0012^{b}	7.7 ± 0.17^{ab}	0.17 ± 0.010^{a}
G (n = 5)	0.957 ± 0.0012^{c}	7.2 ± 0.17^{b}	0.14 ± 0.010^{ab}
H (n = 5)	0.942 ± 0.0012^{d}	8.3 ± 0.17^{a}	0.16 ± 0.010^{ab}
Age	NS	NS	***
Young (n = 16)	0.959 ± 0.0007	7.6 ± 0.09	0.15 ± 0.005^{b}
Medium (n = 8)	0.959 ± 0.0009	7.6 ± 0.12	0.16 ± 0.008^{a}
Old (n = 16)	0.960 ± 0.0006	7.6 ± 0.09	0.13 ± 0.005^{c}
Age × origin	NS	NS	NS

$^{a–d}$Means within a row with different superscripts differ.

*$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$.

a statistically significant impact on a_w, pH, and salt concentration ($P < 0.05$), whereas the age of the shelves did not influence pH, a_w, and salt concentration (the variation of the parameter is below the precision threshold of the technique). Only a slight correlation between a_w and pseudomonads enumeration on shelves was observed ($R^2 = 0.64$, $P < 0.001$).

DISCUSSION

In this project, the native ripening biofilms of wooden shelves and possible major variables that might affect them have been studied for the first time. The results showed that microbial groups on wood ripening biofilm is strongly correlated with the microbial groups of cheese rinds. The main microflora on the rind of Reblochon de Savoie are corynebacteria and yeasts, mostly *Geotrichum candidum* (Bärtschi et al., 1994; A. Thomas, Institut Technique Français des Fromages, La Roche sur Foron, France, personal communication). In the latter 2 studies, the yeast population was found to be quite diversified, whereas, on the shelves, *Geotrichum candidum* appeared to be the main yeast. The influence of the wood or differences in ripening techniques on the farm of origin may explain these contradictory results. For the other microbial groups, no data are available for comparison. In the core of cheese, facultatively heterofermentative lactobacilli and leuconostocs enumerations were usually in the range 5 to 6 $\log_{10}$(cfu/g). On the shelves, facultatively heterofermentative lactobacilli and leuconostocs are not the dominating flora [<4 $\log_{10}$(cfu/cm^2)], which was not surprising because lactic acid bacteria were not the main surface microorganisms. Although enterococci are known to have technological potential, they are sometimes considered to be undesirable in cheese (Giraffa, 2003). The presence of staphylococci was also ambivalent; some species have technological interest (lypolysis and antimicrobial activities; Chamba and Irlinger, 2004), but others are pathogenic (e.g., *Staphylococcus aureus*). The lack of identification of the species of enterococci and staphylococci do not allow us to make any conclusion on the risk associated with the presence of these 2 groups of bacteria on the shelves. But the low levels [means of 3.2 and 3.1 $\log_{10}$(cfu/cm^2)] observed on wooden shelves need to be kept in mind. European Union regulations allow 4 $\log_{10}$(cfu/g) coagulase-positive staphylococci in cheese (law 2073/2005 of November 15, 2005) and staphylococcal toxins are found beyond a level of 5 $\log_{10}$(cfu/g). In cheese ripening, *Pseudomonas* spp. are considered as a spoilage microflora because some species can induce taste defects or produce fluorescent dyes that lead to visual defects on rinds (Gram et al., 2002). Usually enumerated only in the raw milk used in cheese making, the wood microenvironment did not seem particularly favorable to their multiplication because they were detected only at low levels [3.0 $\log_{10}$(cfu/cm^2)]. Coliforms are another spoilage group that were enumerated at very low levels from the shelves analyzed in the summer [<2.2 $\log_{10}$(cfu/cm^2)].

Surprisingly, in view of the contrast in the visual aspect of the shelves and their role in water exchanges during ripening, the age of the shelves did not appear to influence the ecosystem or the physicochemical parameters of the wood. Indeed, the ripening partner observed that young shelves (less than 4 yr old) dried cheeses more efficiently than the oldest. To explain these differences, one might point out that a_w was a surface measurement, when the water regulation of wood was made by fibers in the entire shelf (Carpentier, 1997). The influence of the age of the shelf on wood porosity needs to be explored further to explain the different drying abilities observed by the ripening partner.

The farmhouse origin of cheeses showed a significant influence on minority microbial populations. This result was not surprising because the origins of the cheese were chosen to represent cheeses with different organoleptic features, and it is known that microbial flora, which is influenced by the environments of breeding and milking, influences the organoleptic qualities of cheeses (Michel et al., 2001; Montel et al., 2003). The origin of the cheeses also showed a significant influence on the pH and a_w values, which might be explained by different processing techniques during cheese manufacture and initial ripening by cheesemaker. The pH variations between cheeses of different origins could be explained by microbial diversity because yeasts are responsible for the increase of the pH during cheese ripening (Chamba and Irlinger, 2004) and because acidifying properties are influenced by microbial population (Michel et al., 2001). The differences in a_w could be explained by different contact times between cheeses and the shelves analyzed. This factor could not be overcome because shelves were analyzed at the same stage, the end of the ripening time in the second ripening room, after 5 to 9 d of contact between cheeses and shelves. This stage was also chosen in order not to disturb the ripening process. It appeared that the 4 origins with smallest cheese-shelf contact times (cheeses A, C, G, and H) had the 4 lowest a_w values (0.942 to 0.957), suggesting that contact time played a role in the a_w values of the shelves. The low salt concentration measured on the shelves (0.11 to 0.17 mg/cm^2) was not surprising because Reblochon de Savoie is smeared once in the first ripening room, and the shelves analyzed were taken from the second ripening room, where smearing no longer occurred.

Very poor statistical relations were found between physicochemical values and levels of the different microbial groups. This can be explained by i) the low variation in the microbial groups whatever the age and the origins of the shelves, and ii) the high compatibility of neutral pH, high a_w, and low salt content with microbiological life, except the 2 lowest a_w values for *Pseudomonas* spp. (0.942 and 0.947). Indeed, most yeasts can grow at a_w values of 0.87 to 0.94, lactic acid bacteria at 0.91 to 0.95, halophilic bacteria at 0.75, and *Pseudomonas* spp. at 0.95 (Banwart, 1989; Guiraud, 2003). Shelf pH values (7.1 to 8.3) were also in favor of microbial growth. Indeed, the maximum pH for growth is about 8.0 to 8.5 for most yeasts and 9.0 for most bacteria (Banwart, 1989). Salt concentrations were determined on the first millimeter on the shelf, which corresponded to the main area of bacteria colonization. To interpret these results, the level of salt on the shelves was calculated to be between 3 and 4‰ (wt/wt), which is a level with limited microbiological influence [to compare, the salt level in the physiological saline solution is 9‰ (wt/wt)].

Nevertheless, it must be kept in mind that shelves were only analyzed at the end of the ripening cycle, after 5 to 9 d of contact with the cheeses. The physicochemical parameters and the microbial ecosystems probably vary during ripening, and the study of the dynamic must help to answer the question of the transfer of microorganisms between cheeses and shelves. According to the present study, because the minority microbial populations on shelves were influenced by the farmhouse origins of cheeses, the transfer of these microbial populations might have occurred from the cheeses to the shelves. But the dynamic of the physicochemical parameters may also affect the microbial ecosystem, especially the a_w after the drying stage, which may apply a selection on microflora.

Moreover, it is necessary to stress the fact that the present study was based on microflora enumerations but not on species identification. Because the diversity of species in corynebacteria was found according to the origins of the Reblochon de Savoie rinds (Bärtschi et al., 1994; A. Thomas, Institut Technique Français des Fromages, La Roche sur Foron, France, personal communication), the identification in the present study might show variations on microflora according to the cheese origins.

All these results, the dominance of the technological surface microflora, the homogeneity according to cheese origin, and the low level of undesirable bacteria, must be linked with the ripening techniques used. Indeed, the ripening procedures of the ripening partner were very strict and concerned cheese-shelf relationships, cheese smearing, and shelf cleaning. These led to the predominance over time of the technological microflora and homogeneous levels of the different groups in cheeses of different origins at the end of the ripening on shelves. On the other hand, undesirable microorganisms were maintained at a low level. The technological microbial profile on wooden shelves (majority of technological microflora) had already been found after only 6 mo of use for shelves, and it appeared to be stable from 6 mo to 14 yr of use in ripening.

To conclude, this study clearly demonstrated that the stability of the technological biofilm present on wooden shelves was linked to rigorous ripening techniques.

Further research on microbial ecology is necessary to explore whether this technological microbial profile is also found at other stages of ripening on shelves, especially on shelves after cleaning. Further description and control of the microbial interactions of stable native biofilms with undesirable microorganisms will be a challenge for the cheese ripeners. The original consortium found on wooden shelves could play an active role in determining the safety of wooden shelves in the traditional ripening process.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by the French Association de Coordination Technique pour l'Industrie Agro-alimentaire (ACTIA). We are very grateful to the SARL Joseph Paccard for providing shelves. We also thank Florence Dubois-Brissonnet for MEB analyses. We are indebted to professional partners (Syndicat Interprofessionnel de Reblochon, Arilait Recherches, Comité des Appellations d'Origine Laitières, Entremont-Alliance, Aérial) for their financial and intellectual support.

REFERENCES

Banwart, G. J. 1989. Basic Food Microbiology. 2nd ed. Van Nostrand Reinhold, New York, NY.

Bärtschi, C., J. Berthier, and G. Valla. 1994. Evolution of the surface fungal flora of Reblochon cheese. Lait 74:105–114.

Bockelmann, W., and T. Hoppe-Seyler. 2001. The surface micro-flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. Int. Dairy J. 11:307–314.

Carpentier, B. 1997. Sanitary quality of meat chopping board surfaces: A bibliographical study. Food Microbiol. 14:31–37.

Chamba, J. F., C. Beal, C. Delbes, M. C. Montel, J. M. Panoff, B. Thammavongs, and A. Thomas. 2005. Sauvegarde de consortia microbiens fromagers: Mise au point de methodes de conservation ex situ à long terme. Les Actes du Bureau des Ressources Génétiques. 5:393–409.

Chamba, J. F., and F. Irlinger. 2004. Secondary and adjunct cultures. Pages 191–206 in Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands.

Denis, C., M. Gueguen, E. Henry, and D. Levert. 2001. New media for the numeration of cheese surface bacteria. Lait 81:365–379.

Duthoit, F., J. J. Godon, and M. C. Montel. 2003. Bacterial community dynamics during production of Registered Designation of Origin

Salers Cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. Appl. Environ. Microbiol. 69:3840–3848.

European Commission. 1996. 96/536/EC: Commission Decision of 29 July 1996 establishing the list of milk-based products in respect of which Member States are authorized to grant individual or general derogations pursuant to Article 8 (2) of Directive 92/46/EEC and the nature of the derogations applicable to the manufacture of such products. JO L230/12 of the 11 September 1996.

European Commission. 2005. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. JO L338/1 of the 22 December 2005.

Feurer, C., F. Irlinger, H. E. Spinnler, P. Glaser, and T. Vallaeys. 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. J. Appl. Microbiol. 97:546–556.

Gehrig, M., G. Schnell, E. Zürcher, and L. J. Kucera. 2000. Hygienic aspects of wood and polyethylen cutting boards regarding food contaminations. A comparison. Holz als Roh- und Werkstoff. 58:265–269.

Giraffa, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. Int. J. Food Microbiol. 88:215–222.

Gough, N. L., and C. E. R. Dodd. 1998. The survival and disinfection of *Salmonella typhimurium* on chopping board surfaces of wood and plastic. Food Contr. 9:363–368.

Gram, L., L. Ravn, M. Rasch, J. B. Bruhn, A. B. Christenen, and M. Givskov. 2002. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. Int. J. Food Microbiol. 78:79–97.

Guiraud, J. P. 2003. Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris, France.

Isolini, D., M. Grand, and H. Glättli. 1990. Selecktivmediem zum Nachweis von obligat und fakultativ heterofermentativen Laktobazillen. Schweiz. Milchw. Forschung. 19:57–59.

Maoz, A., R. Mayr, and S. Scherer. 2003. Temporal stability and biodiversity of two complex antilisterial cheese-ripening microbial consortia. Appl. Environ. Microbiol. 69:4012–4018.

Michel, V., A. Hauwuy, and J. F. Chamba. 2001. Raw cow milk microflora: Diversity and influence of conditions of production. Lait 81:575–592.

Milling, A., R. Kehr, A. Wulf, and K. Smalla. 2005. Survival of bacteria on wood and plastic particles: Dependence on wood species and environmental conditions. Holzforschung 59:72–81.

Montel, M. C., E. Beuvier, and A. Hauwuy. 2003. Pratiques d'élevage, microflore du lait et qualités des produits laitiers. INRA Prod. Anim. 16:279–282.

Nickels, C., and H. Leesment. 1964. Method for the differentiation and quantitative determination of starter bacteria. Milchwissenschaft 19:374–378.

Ogier, J. C., V. Lafarge, V. Girard, A. Rault, V. Maladen, A. Gruss, J. Y. Leveau, and A. Delacroix-Buchet. 2004. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturating gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 70:5628–5643.

Oulahal-Lagsir, N., A. Martial-Gros, M. Bonneau, and J. L. Blum. 2003. "*Escherichia coli*-milk" biofilm removal from stainless steel surface: Synergism between ultrasonic waves and enzymes. Biofouling 19:159–168.

Prechter, S., M. Betz, G. Cerny, G. Wegener, and E. Windeisen. 2002. Hygiene aspects of wooden resp. plastic cutting boards. Holz als Roh- und Werkstoff. 60:239–248.

Revol-Junelles, A. M., R. Miguindou-Mabiala, D. Roger-Maigne, and J. B. Milliere. 2005. Behavior of *Escherichia coli* cells and *Bacillus cereus* spores on poplar wood crates by impedance measurements. J. Food Prot. 68:80–84.

Richard, J. 1997. Utilisation du bois comme matériau au contact des produits laitiers. C.R. Acad. Agric. Fr. 83(5):27–34.

Schönwälder, A., R. Kehr, A. Wulf, and K. Smalla. 2002. Wooden boards affecting the survival of bacteria? Holz als Roh- und Werkstoff. 60:249–257.

Swaffield, C. H., J. A. Scott, and B. Jarvis. 1997. Observations on the microbial ecology of traditional alcoholic cider storage vats. Food Microbiol. 14:353–361.

Welker, C., N. Faiola, S. Davis, I. Maffatore, and C. A. Batt. 1997. Bacterial retention and cleanability of plastic and wood cutting boards with commercial food service maintenance practices. J. Food Prot. 60:407–441.

Wenning, M., V. Theilmann, and S. Scherer. 2006. Rapid analysis of two food-borne microbial communities at the species level by Fourier-transform infrared microspectroscopy. Environ. Microbiol. 8:848–857.

Chapitre 3 : Comportement de *L. monocytogenes* inoculée sur des planches d'affinage

I. Introduction

Les relations entre *Listeria* et les surfaces au contact alimentaire sont devenues des points clefs pour la maîtrise sanitaire de ce pathogène dans le secteur agro-alimentaire. Les planches d'affinage utilisées en fromagerie ont deux particularités spécifiques en tant que surface au contact alimentaire : elles sont constituées de bois et elles présentent à leur surface un biofilm, composé majoritairement des flores de surface des fromages en contact avec ces planches. Le chapitre 2 des résultats a été consacré à l'étude de l'écosystème de la surface des planches d'affinage de reblochon.

Pour le support bois, en comparaison avec les autres supports (polypropylène, caoutchouc, acier inoxydable et verre), très peu d'études ont été réalisées sur les interactions entre ce matériau et les micro-organismes. Ces études sont de plus, souvent réalisées dans des conditions expérimentales différentes et contradictoires (Carpentier, 1997). Par la suite, différentes études ont été réalisée sur la nettoyabilité de ce matériau et la survie des micro-organismes en contact avec le bois, sans réel consensus. Gehrig *et al*. (2000) et Revol-Junelles *et al*. (2005) ont démontré que le bois sec ou en atmosphère sèche est un environnement peu ou pas favorable au développement bactérien. D'autres études ont insisté sur la pénétration des bactéries dans le bois (Welker *et al*., 1997 ; Gough et Dodd, 1998). Enfin, pour certains auteurs plusieurs paramètres sont à maîtriser afin de limiter le développement bactérien sur le bois : stockage au sec, manipulation correcte et le choix d'essences spécifiques (pin, chêne et frêne blanc) (Millet *et al*., 1996 ; Pretcher *et al*., 2002 ; Schönwälder *et al*., 2002 ; Milling *et al*., 2005).

Pour les planches d'affinage, la présence d'un biofilm sur leur surface est une deuxième particularité. Or, les interactions microbiennes peuvent jouer un rôle majeur dans le

comportement de *Listeria* en biofilm. De nombreux auteurs ont démontré la difficulté de *Listeria* à croître sur des biofilms. Carpentier et Chassaing (2004) ont montré que seulement 4 souches sur 29 (*Kocuria varians*, *Staphylococcus capitis*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Comamonas testosteroni*), isolées dans des industries agroalimentaires, ont permis le développement de *Listeria* en co-culture sur de l'acier inoxydable. Plusieurs mécanismes peuvent intervenir : diminution de l'adhésion par la synthèse de exo-polysaccharides (Meylheuc *et al*., 2006 ; Valle *et al*., 2006), production de bactériocines (Leriche *et al*., 1999 ; Loessner *et al*., 2002), compétition (Jeong et Franck, 1994 ; Zhao *et al*., 2006 ; Gnamou Besse *et al*., 2006).

A notre connaissance, seules trois publications ont été réalisées à ce jour sur l'interaction entre *Listeria monocytogenes* et le bois dans un contexte fromager. Lors d'une recherche de *L. monocytogenes* dans l'environnement d'une industrie de fabrication de fromage sur une période de 10 mois réalisée par Menendez *et al*. (1997), ce pathogène a été isolé sur une planche en bois pour 5 testées ainsi que dans du lait cru (1 échantillon), sur 4 échantillons de surface (murs, machines et sol). Par contre, l'étude de Silva *et al.* (2003), *L. monocytogenes* n'a pas pu être isolée sur les 5 échantillons de planches en bois, alors qu'un échantillon de lait cru et un échantillon du sol se sont révélés positifs. Carminati *et al*. (2000) ont démontré une contamination croisée moins importante entre des fromages contaminés avec *L. monocytogenes* et les planches en bois, lorsque la population à la surface du fromage était plus importante de 2 Log(UFC). Les planches en bois avaient été préalablement décontaminées à l'eau de Javel (200 ppm pendant 30 min).

Dans ce contexte, l'objectif de ce chapitre est d'étudier le comportement de *L. monocytogenes* inoculée sur des planches d'affinage de reblochon de Savoie. Après un premier criblage du comportement de 5 souches *L. monocytogenes*, 2 souches ont été choisies. Pour obtenir le témoin « absence d'activité microbienne du biofilm », l'autoclavage des planches a été choisi. Le comportement de ces 2 souches a été étudié en fonction de la présence d'un biofilm natif ou autoclavé, de l'origine des fromages affinés sur les planches, du stade de prélèvement des planches et du taux initial d'inoculation de *L. monocytogenes*. Les populations de *Listeria* sur les planches ont été suivies après 1, 5, 8 et 12 jours d'incubation à 15°C et 99% d'humidité relative. Les paramètres physicochimiques des planches (pH, a_w et humidité) ainsi que les principales flores microbiennes du biofilm ont été suivis.

II. Matériel et méthodes

1. Processus d'affinage du reblochon de Savoie

Comme décrit dans le chapitre 1, chez l'affineur partenaire, les fromages proviennent de 20 producteurs différents après une durée minimum de 10 jours après la fabrication. Ils sont affinés sur des planches en bois en 2 étapes, se déroulant dans 3 caves différentes. Dans la première cave (11°C et 95% HR), les fromages sont lavés une fois, retournés quotidiennement et les planches régulièrement changées. Dans les caves 2-3 (13°C et 95% HR), les fromages sont affinés pendant 5 à 9 jours et les planches ne sont plus changées et restent en contact avec les mêmes fromages, sans lavage. Les planches analysées dans notre étude étaient choisies en cave 2-3. Les planches utilisées pour l'affinage sont en épicéa (*Picea abies*) et sont coupées dans le sens longitudinal, sans rabotage. Les planches prélevées dans cette étude étaient âgées de 6 mois à 14 ans, ce qui correspond à leur durée d'utilisation en affinage. Chaque planche a 13 empreintes sur chaque face, qui correspondent aux zones de contact entre les fromages et la planche. Après l'affinage d'un lot de fromage, chaque planche est brossée mécaniquement à l'eau froide puis séchée à l'air ventilé. Les planches sont ensuite prises au hasard pour l'affinage d'un nouveau lot de fromages.

Les descriptions du processus d'affinage et de l'écologie microbienne dans le chapitre précédent ont mis en évidence plusieurs facteurs de variation de la composition microbienne du biofilm présent sur les planches d'affinage. Ces facteurs pourraient aussi influencer le comportement de *Listeria* sur ce biofilm : le stade de prélèvement du biofilm et l'origine des fromages affinés sur les planches. Les 2 stades de prélèvement retenus pour la suite de l'étude sont les stades « fin d'affinage » et « après nettoyage ». Ce dernier correspond au stade où le risque d'introduction des flores pathogènes dans les caves d'affinage est le plus important. En effet, la majorité des contaminations en *Listeria* dans la filière Reblochon interviennent avant l'arrivée des fromages en affinage (Syndicat Interprofessionnel de Reblochon, communication personnelle). Ainsi, le stade après nettoyage est le stade critique pour empêcher la dissémination des pathogènes via les planches dans les caves, suite à une contamination accidentelle apportée par les fromages. En plus du stade de prélèvement, l'origine des fromages affinés sur la planche peut influencer le comportement des *Listeria* déposées sur le biofilm en raison des variations des flores

minoritaires décrites dans le chapitre 2. Quatre origines avec des profils microbiens minoritaires différents ont été choisis (A, B, C et H), selon l'Analyse Fractionnelle de Correspondance Simple (AFCS) (Figure II. 9 du chapitre 2) et pour des raisons pratiques. En effet, ces 4 producteurs fournissent un grand nombre de fromages à l'affineur, ce qui assure une disponibilité régulière de planches pour ces 4 origines, à la différence du producteur F.

2. Transport des planches d'affinage des caves au laboratoire et préparation des échantillons.

Le protocole expérimental du suivi des *Listeria* inoculées sur les planches d'affinage de fromages est détaillé sur la Figure I.1. Le jour précédant l'inoculation (J-1), pour les stades fin d'affinage et après nettoyage, les planches étaient transportées des caves d'affinage jusqu'au laboratoire emballées individuellement dans du film alimentaire et placées entre 2 planches à la même humidité et non emballées, dans un caisson isotherme pendant 2 h, afin de modifier le moins possible le biofilm et les caractéristiques des planches. Les planches étaient ensuite sciées en carrés de 12 cm sur 12 centrés sur les empreintes (13 cm de diamètre), et certaines empreintes étaient autoclavées à 125°C pendant 15 min, emballées dans du papier aluminium. Une empreinte par planche était réservée à la vérification de l'absence de *Listeria* avant l'inoculation. Cette empreinte était incubée directement dans du bouillon Fraser (Biokar, Beauvais, France) pour un enrichissement selon la norme ISO 11290 (anonyme, 1997b). Huit empreintes par planches étaient utilisées pour le suivi du comportement de *Listeria* sur les planches

Les suivis à différents jours d'incubation étaient réalisés sur des échantillons d'empreintes issues d'une même planche pour une combinaison spécifique de facteurs (taux d'inoculation, souche de *Listeria*, stade de prélèvement et état du biofilm (natif ou autoclavé)). Ainsi, pour 2 jours de suivi (J1 et J12) et 2 répétitions, 2 combinaisons de facteurs étaient étudiées sur les 8 échantillons d'empreintes d'une même planche. Par contre, pour les 4 jours de suivi de la cinétique et avec 2 ou 3 répétitions, 1 seule combinaison de facteurs était étudiée sur une planche (Tableau III.1). Les paramètres physico-chimiques (a_w, pH et humidité) ont été mesurés sur les mêmes empreintes au cours des 12 jours d'incubation. Pour ces suivis, les empreintes natives et

autoclavées provenaient d'une même planche (Tableau III.1). Pour toute l'étude, un échantillon correspondait à un dénombrement de *L. monocytogenes*.

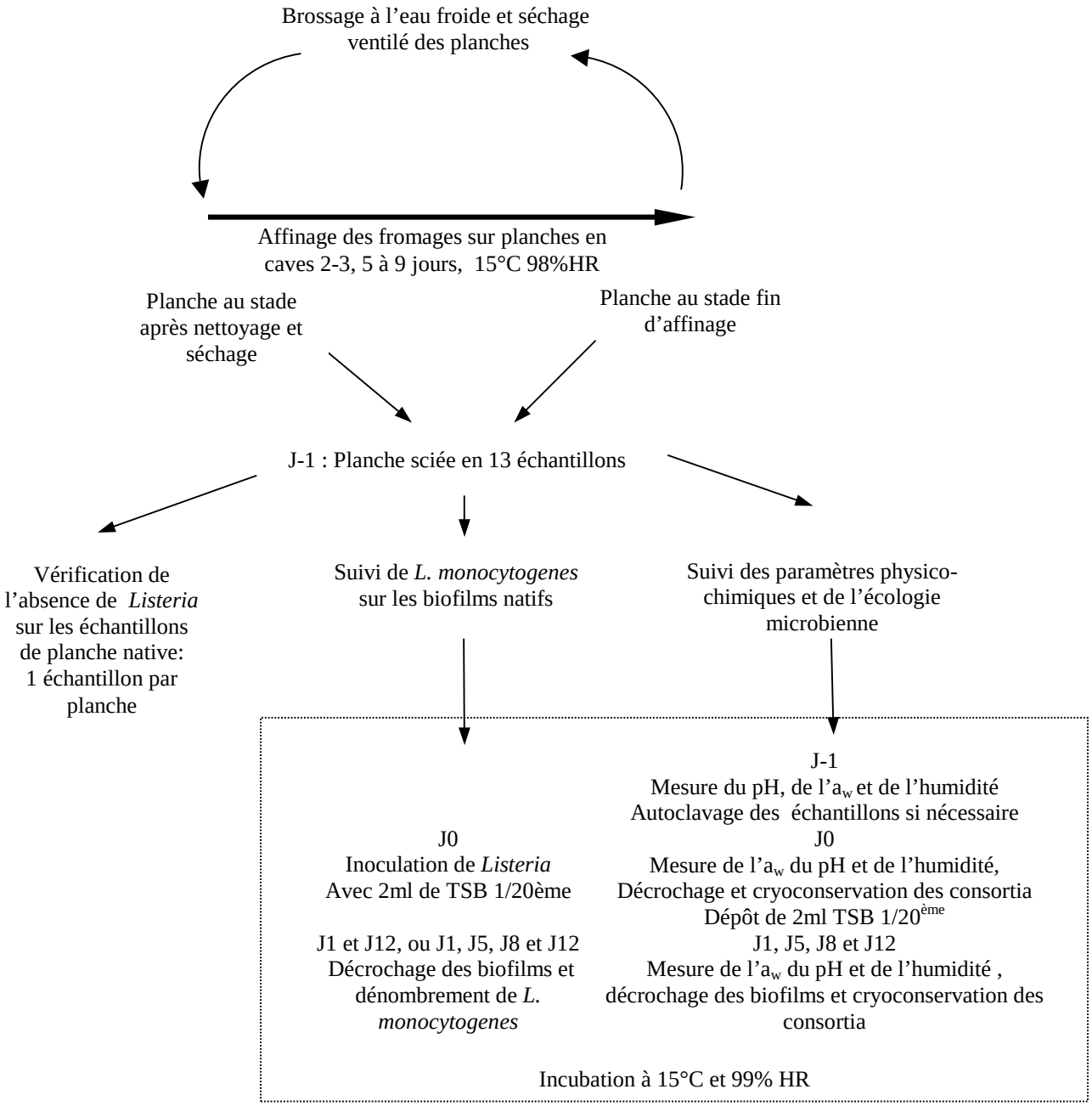


Figure III.1. Protocole expérimental du suivi des *Listeria* après inoculation sur planches d'affinage pendant 12 jours à 15°C et 99% HR. J-1 : jour du sciage et de l'autoclavage des échantillons d'empreintes, J0 : jour de l'inoculation des échantillons d'empreintes par *L. monocytogenes*, J1, J5, J8 et J12 : jours de décrochage et de dénombrement des *L. monocytogenes*.

Tableau III.1 Répartition des analyses sur les planches pour un stade de prélèvement (fin d'affinage et après nettoyage) lors du suivi de *L. monocytogenes* à J1, J5, J8 et J12.

Planche	Nombre d'échantillons analysés	Analyse effectuée	Répartition des facteurs
1	12	Suivi d'une 1ère souche de *L. monocytogenes* après une inoculation à 1 Log(ufc/cm²)	4 durées d'incubation x 3 répétitions
2	12	Suivi d'une 2ème souche de *L. monocytogenes* après une inoculation à 1 Log(ufc/cm²)	4 durées d'incubation x 3 répétitions
3	8	Suivi d'une 1ère souche de *L. monocytogenes* après une inoculation à 3 Log(ufc/cm²)	4 durées d'incubation x 2 répétitions
	4	Suivi de l'humidité	2 états (natif/autoclavé) x 2 répétitions
4	8	Suivi d'une 2ème souche de *L. monocytogenes* après une inoculation à 3 Log(ufc/cm²)	4 durées d'incubation x 2 répétitions
	4	Suivis du pH et de l'a_w	2 états (natif/autoclavé) x 2 répétitions
5	5	Suivi de l'écologie microbienne	5 décrochages (J0, J1, J5, J8 et J12)

Chaque échantillon était ensuite placée sur un support (boite de Pétri retournée) dans une boite hermétique, stérilisée par autoclavage (121°C, 15 min) avec un fond d'eau pour saturer l'atmosphère en humidité (Figure III.2). Les boîtes étaient ensuite placées à 15°C, afin de reproduire les conditions des caves. Une température supérieure de 3°C par rapport à la température des caves d'affinage (12°C) a été choisie pour les conditions de laboratoire, ceci afin de diminuer la durée d'incubation nécessaire pour suivre le comportement de *L. monocytogenes* sur les planches. Au cours des 12 jours d'incubation, les boites hermétiques étaient ouvertes 1 à 2 fois, pour renouveler l'oxygène. A l'aide d'un anaérotest (Merck, Lyon , France), l'absence d'anaérobiose a été vérifiée pendant les 12 jours d'incubation.

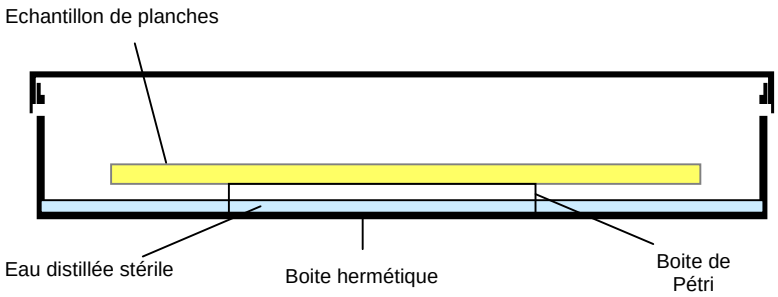


Figure III.2 Schéma du dispositif expérimental d'incubation des échantillons de planches

3. Préparation de la suspension d'inoculation avec les souches de *L. monocytogenes*

Cinq souches de *L. monocytogenes*, stockées à -80°C, ont été étudiées dans cette partie (Tableau III.2). Elles provenaient de la collection d'Aérial (Illkirch, France). Elles ont toutes été isolées dans l'environnement agro-alimentaire sauf pour la souche CIP 78.38 et elles sont toutes de sérotypes associés à des épidémies de listériose humaine.

Tableau III.2. Souches de *L. monocytogenes* étudiées

Souches	Autre code	Sérotype	Source
154	AER 101	4b	Lait
162	AER 102	1/2a	Saumure de fromagerie
367	CIP 78.38	4b	Clinique
481		1/2b	Lait
767	UNIR 100	4b	Fromage

Toutes les souches ont été fournies par Aérial (Illkirch, France).

Deux jours avant chaque expérimentation, 0,5 ml de culture congelée de chaque souche étudiée était inoculé dans 9 ml de TSB (Trypcase Soy Broth, Biomérieux, Marcy l'étoile, France) et incubé à 37°C. Le même jour, 1 ml de la première pré-culture était transféré dans 9 ml de TSB à 37°C et après 24h, 1 ml de la deuxième pré-culture était transféré dans 100 ml de TSB à 37°C. Le jour de l'inoculation des planches (J0), les cultures de *L. monocytogenes* étaient lavées 2 fois avec de l'eau physiologique (NaCl, 9‰, Cooper, Melun, France) après centrifugation à 2500 g pendant 10 min. Pour l'inoculation des échantillons de planches, les *Listeria* étaient mises en suspension dans du TSB dilué au vingtième (1/20ème), et les suspensions diluées selon le même

procédé pour obtenir un taux d'inoculation sur les planches de 10^7 UFC/cm² (2 ml déposés sur 64 cm²). Le TSB 1/20ème a été choisi pour son apport nutritionnel modéré. Les autres taux d'inoculation, 10^3 et 10^1 UFC/cm², étaient obtenus par des dilutions dans du TSB au 1/20ème. Les suspensions d'inoculation étaient ensuite dénombrées sur une gélose Palcam (Merck, Lyon, France) (incubation 48h à 37°C). Dans certains cas, le TSB 1/20ème a été remplacé par de l'eau distillée stérile ou supplémenté avec une suspension de décrochage de biofilm autoclavé. Pour cela, 120 cm² de planche autoclavée ont été prélevés par brossage, centrifugés à 2500 g pendant 10 min puis repris dans 4 ml d'une suspension de *Listeria* à 10^4 UFC/ml (TSB 1/20ème).

4. Inoculation et suivi de la population de *L. monocytogenes* sur les échantillons de planche

Pour inoculer les échantillons de planche, 2 ml des suspensions d'inoculation de *L. monocytogenes* étaient déposés sur une surface de 64 cm² située sur une empreinte, délimitée par un joint en caoutchouc (Figures III.3 et III.4). Les 2 ml étaient ensuite soigneusement répartis sur toute la surface inoculée avec des mouvements circulaires. Un poids (200g) était ensuite appliqué sur le joint de caoutchouc par l'intermédiaire d'un support rond (boite de Pétri 90 mm) pendant 30 min. Les échantillons de planche étaient ensuite ré-incubés à 15°C et à 99 % HR.

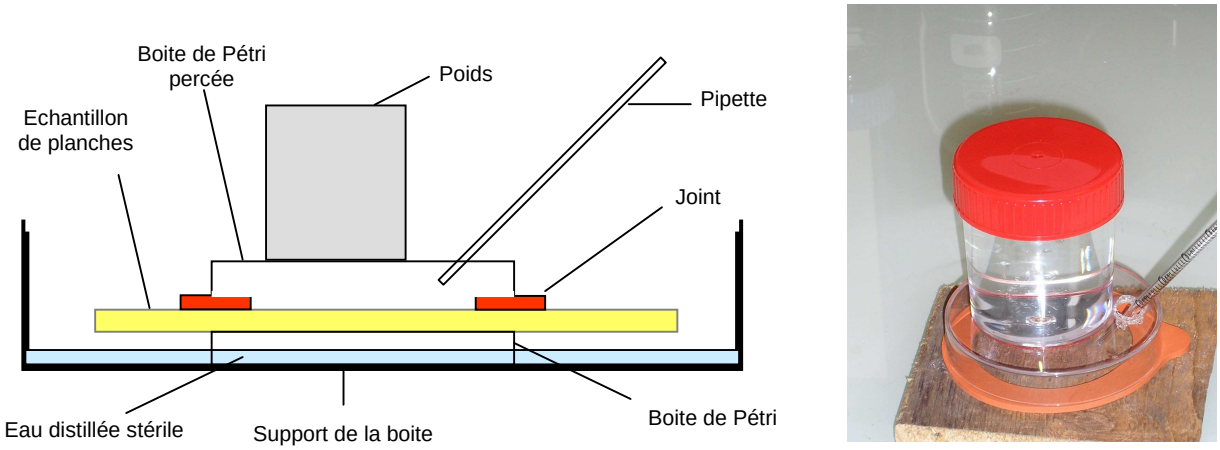


Figure III.3. Schéma et photo du dispositif expérimental d'inoculation des échantillons

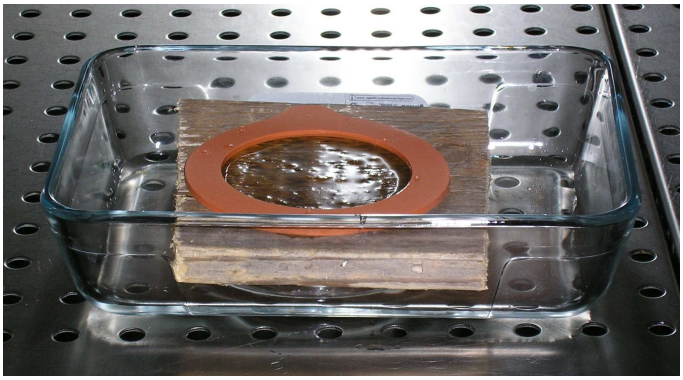


Figure III.4. Un échantillon de planche juste après l'inoculation

Pour suivre le comportement de *Listeria* sur les biofilms, le décrochage était réalisé avec un générateur d'ultrasons (40 kHz) (Branson Ultrasonics, Rungis, France) connecté à une sonotrode portable d'un diamètre de 15 mm et une chambre de prélèvement. Les ultrasons étaient délivrés pendant 10 s dans la chambre de prélèvement, préalablement remplie avec 15 mL de Ringer (solution au 1/4) stérile (Biokar, Beauvais, France), directement sur 10 cm² de biofilm, selon le protocole décrit par Oulahal-Lagsir *et al*. (2003). Un joint en caoutchouc assurait l'étanchéité de la chambre en acier inoxydable. La suspension de décrochage était ensuite homogénéisée à l'aide d'une pipette et placée dans un flacon stérile. Elle constituait la solution mère (10^0) sur laquelle les dénombrements microbiologiques étaient effectués. Le protocole précis est détaillé dans l'annexe 2. Le jour du décrochage, les *Listeria* étaient dénombrées sur une gélose Palcam (Merck, Lyon, France).

La cultivabilité des 5 souches de *L. monocytogenes* après application des ultrasons a été évaluée. Pour ce, des ultrasons avec les mêmes caractéristiques que pour le décrochage ont été appliqués pendant 10 s dans 15 ml de TSB 1/20ème contenant chaque souche de *L. monocytogenes* (10^4 UFC/ml) directement dans la chambre de prélèvement utilisée pour le décrochage. Les *Listeria* ont été dénombrées avant et après application des ultrasons, sur une gélose Palcam.

5. Décrochage, cryoconservation et dénombrements des consortia microbiens présents sur les planches d'affinage

Pour suivre l'évolution des flores microbiennes, le décrochage était réalisé par brossage. Comme décrit dans le chapitre 2, une surface de 10 cm^2 d'une empreinte de la planche d'affinage était brossée à l'aide d'une brosse à dent, et d'un diluant (Ringer) contenant du Tween 80 et de l'Agar. Le diluant contenant les micro-organismes décrochés était épongé et récupéré à l'aide de chiffonnettes stériles qui étaient ensuite placées dans un sac Stomacher contenant 30 ml de Ringer. Après un passage au Stomacher, la suspension de décrochage était placée dans un flacon stérile et constituait la solution mère (10^0) sur laquelle les dénombrements microbiologiques étaient effectués. Le mode opératoire est détaillé dans l'annexe 2.

Pour des raisons pratiques, les dénombrements des flores du consortium n'ont pas pu être effectués le même jour que le suivi du comportement de *Listeria*. Dans ce cas, la cryoconservation a permis de différer les analyses microbiologiques. La suspension de décrochage était mélangée (volume/volume) avec une solution de lait stérile (110 g/L, Prolait, Eurial Poitouraine, Jaunay Clan, France), supplémentée avec 15% (m/m) de glycérol (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), avant une congélation à –80°C selon le protocole décrit par Chamba *et al*. (2005). Tous les échantillons ont ensuite été décongelés pendant 20 min à température ambiante après un stockage de 2 mois à –80°C.

Les dénombrements ont ensuite été effectués en double, en surface, à l'aide d'un ensemenceur spiral (Interscience, Saint Nom La Bretèche, France). Les différents milieux ainsi que les conditions d'incubation sont résumés dans le Tableau II.1 du chapitre 2.

6. Caractérisation physico-chimique de la surface des planches d'affinage

Comme décrit dans le chapitre 2, la mesure du pH à la surface des planches d'affinage était réalisée à 15°C avec une électrode de surface (Crison, Allela, Espagne). L'a_w était déterminée avec un appareil à point de rosée (FA-st/1, GBX Scientific Instruments, Romans sur Isère, France). Pour obtenir le taux d'humidité des planches, 2 planches au même stade d'affinage étaient superposées sur une structure non métallique, puis un humidimètre électronique de type

DS4A-DOMA (Scangaule, Gravigny, France) était déposé sur la surface de la planche du dessus et la teneur en eau enregistrée, exprimée en % (m/m).

7. Spectroscopie infrarouge

Afin d'obtenir des spectres IRTF-ATR (Attenuated Total Reflectance), des planches ont été directement déposés sur le cristal ZnSe ATR et les spectres enregistrés dans les mêmes conditions que celles décrites au chapitre 2. Les spectres ont ensuite été pré-traités à l'aide du logiciel Opus NT 3.1 (Brucker optics, Wissembourg, France) avec une normalisation vectorielle sur toute la surface, ce qui permet une analyse à la fois qualitative et quantitative, ainsi qu'une correction de la ligne de base (Adt *et al*., 2006).

8. Analyses statistiques

Les dénombrements sont exprimés en Log(UFC/cm²). Pour évaluer l'influence des différents facteurs décrits à la section ci-dessus, des analyses de variance ont été réalisées avec le logiciel "Splus 2000" (Mathsoft, Seattle, USA). Les principaux effets et les interactions ont été estimés avec une analyse de variance ANOVA (de type III en cas de groupes déséquilibrés), et des comparaisons de moyenne (test de Bonferoni, avec un niveau significatif de $P < 0,05$). Lorsqu'un seul facteur était étudié, les écart-types ont été utilisés pour différencier les groupes.

II Résultats- Discussion

1. Choix de souches de *L. monocytogenes*

Préalablement, 2 souches ont été sélectionnées parmi les 5 choisies pour l'étude : 4 issues de matrices alimentaires ou de l'environnement alimentaire (souches 154, 162, 481, 767) et une de collection (souche 367, d'origine clinique). Ce choix est basé sur la résistance de ces souches aux ultrasons et un premier criblage de leur comportement sur les planches d'affinage.

1.1 Cultivabilité des 5 souches de *L. monocytogenes* après application des ultrasons

Premièrement, la résistance de 5 souches de *L. monocytogenes* aux ultrasons est évaluée par détermination de la cultivabilité après application des ultrasons. Les 5 souches ont été dénombrées avant et après application des ultrasons, avec 2 répétitions, soit un total de 20 résultats, résumés sur la Figure III.5. Pour les 5 souches, l'application des ultrasons aux mêmes conditions que pour le décrochage n'entraîne pas de modification de la cultivabilité. Ce résultat est en accord avec l'étude de Sinde et Carballo (2000) qui démontre que la viabilité de *L. monocytogenes* n'était pas modifiée après une sonication de 40 kHz pendant 20s. Ainsi, les ultrasons peuvent être utilisés comme méthode de prélèvement des *L. monocytogenes* inoculées sur les échantillons de planche, indifféremment sur les 5 souches.

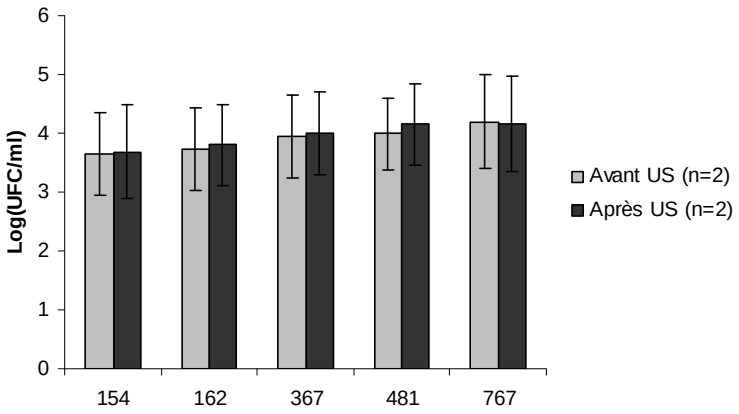


Figure III.5. Comparaison des dénombrements des 5 souches de *L. monocytogenes* avant et après application des ultrasons (10s, 40kHz) en suspensions dans la chambre de prélèvement. Les barres d'erreurs correspondent aux écart-types. US : ultrasons.

1.2 Suivis des populations sur planche des 5 souches de *L. monocytogenes*

Un test de comportement des 5 souches sur planches d'affinage a été réalisé afin de sélectionner les 2 souches. La plus et la moins inhibée par les planches d'affinage ont été choisies. Les comportements des 5 souches de *L. monocytogenes* ont été étudiés avec 2 taux d'inoculation (10^3 et 10^7 UFC/cm²) et 2 répétitions à 2 temps d'incubation 1 et 12 jours soit un total de 40 résultats.

Les 5 planches d'affinage avaient été utilisées pour l'affinage des fromages de l'origine C pendant la saison hivernale. Elles avaient subi un brossage mécanisé à l'eau froide mais n'avaient pas eu le temps de sécher chez l'affineur selon son protocole habituel. Le séchage a donc du être effectué au laboratoire. Les suivis des populations des 5 souches de *L. monocytogenes* à 1 et 12 jours d'incubation sont représentés sur la Figure III.6. Pour les 2 taux d'inoculation, la souche qui paraissait la plus inhibée était la souche 162, avec une différence de 3,5 Log(UFC/cm²) entre 1 et 12 jours d'incubation ($P < 0,05$), pour le taux d'inoculation de 10^7 UFC/cm². Pour les autres souches, aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence entre 1 et 12 jours d'incubation ($P > 0,05$). Pour le taux d'inoculation à 10^3 UFC/cm², la population de la souche 481 est la plus élevée à J1 et J12 et pour le taux à 10^7 UFC/cm², ce sont les populations des souches 481 et 367 (résultats non significatifs). Il est à noter que le séchage au laboratoire n'a pas pu être reproduit dans les mêmes conditions que chez l'affineur. Le mode de séchage différent a peut-être modifié le biotope et le consortium microbien, ce qui a pu modifier le comportement des 5 souches de *L. monocytogenes* sur les planches. Ainsi, les conditions des suivis de population des 5 souches de *L. monocytogenes* sur ces planches ne correspondent pas tout à fait aux conditions trouvées en cave d'affinage.

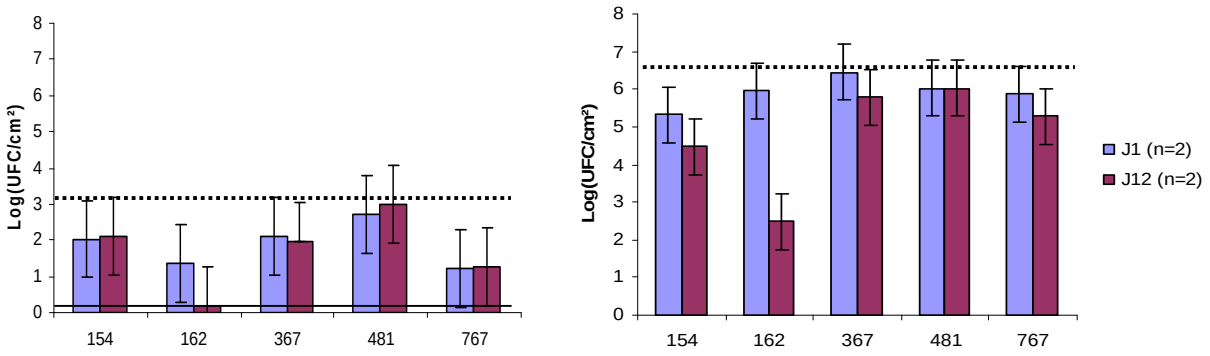


Figure III.6. Evolution des populations de 5 souches de *L. monocytogenes* inoculées sur des échantillons de planches d'affinage après nettoyage et séchage au laboratoire, à 15°C et 98% HR. Les lignes en pointilles correspondent aux taux d'inoculation (3 et 7 Log(UFC/cm²)). La ligne pleine correspond au seuil de détection (0,18 Log(UFC/cm²)). Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance.

Pour l'étude du comportement de *L. monocytogenes* sur les planches d'affinage, les souches de *L. monocytogenes* 481 et 162 ont été choisies pour les raisons suivantes. La souche 162 est de sérotype 1/2a le plus fréquemment isolé dans les industries agro-alimentaires (Gillot *et al*., 1996). De plus, ces 2 souches ont les propriétés de surface les plus éloignées, et elles correspondent d'après les résultats ci-dessus, aux souches la plus et la moins inhibée par les planches d'affinage. La cultivabilité des ces 2 souches n'est pas influencée par l'application des ultrasons.

2. Effets des modalités expérimentales sur les caractéristiques physico-chimiques des planches et sur le consortium présent sur les planches

Dans le chapitre 2, l'étude du biotope de la surface des planches a révélé des conditions favorables à la croissance bactérienne pour le stade fin d'affinage et non favorables pour le stade après nettoyage. Les modes d'inoculation des *L. monocytogenes*, d'incubation des échantillons et l'autoclavage des planches peuvent modifier ce biotope et donc son influence sur la croissance microbienne. Dans cette partie, les effets des modalités expérimentales sur le biotope et les conditions de croissance de *L. monocytogenes* sont détaillés ainsi que l'évolution des flores du consortium présent à la surface des échantillons.

2.1 Influence du mode d'inoculation

Le choix du volume d'inoculation de 2 ml a été réalisé en fonction de la surface délimitée par le joint. En effet, pour 64 cm², 2 ml sont nécessaires pour recouvrir de liquide la totalité de la surface et s'assurer d'un dépôt homogène, à condition de laisser l'échantillon de planche horizontal pendant la pénétration du liquide. L'impact de ce mode de dépôt sur les paramètres physico-chimiques de l'environnement microbiologique des planches d'affinage, ainsi que l'apport nutritif de la suspension d'inoculation ont été déterminé.

2.1-1 Influence du mode d'inoculation sur les paramètres physicochimiques (a_w, pH)

Pour évaluer l'influence du dépôt de 2 ml de TSB 1/20ème sur les paramètres physico-chimiques des planches d'affinage, ces paramètres (pH et a_w) ont été enregistrés en double sur 2 planches (origine C) aux 2 stades de prélèvement à 0, 5 et 24 h après le dépôt, soit un total de 24 valeurs d'a_w et de pH. Après l'inoculation, les échantillons de planche étaient placés dans les conditions d'incubation telles que décrites dans le Figure III.2. Les paramètres physico-chimiques mesurés (a_w, pH) sont représentés sur la Figure III.7. Le temps intermédiaire de 5h a été choisi car il correspondait au temps nécessaire pour une absorption des 2 ml par la planche. Pour les 2 stades, aucune différence statistiquement significative des valeurs de pH n'a pu être mise en évidence en fonction du dépôt des 2 ml ($P < 0,05$). Pour le stade avant nettoyage (fin d'affinage), la valeur de l'a_w à 5 h est statistiquement plus élevée que cette valeur avant le dépôt (0h) (0,968 et 0,947, respectivement), par contre il n'y a pas de différence significative entre les valeurs d'a_w avant le dépôt et 24h après (0,947 et 0,951, $P>0,05$). Pour le stade après nettoyage, les valeurs d'a_w à 0, 5 et 24h sont statistiquement différentes (0,878, 0,963, et 0,922, respectivement).

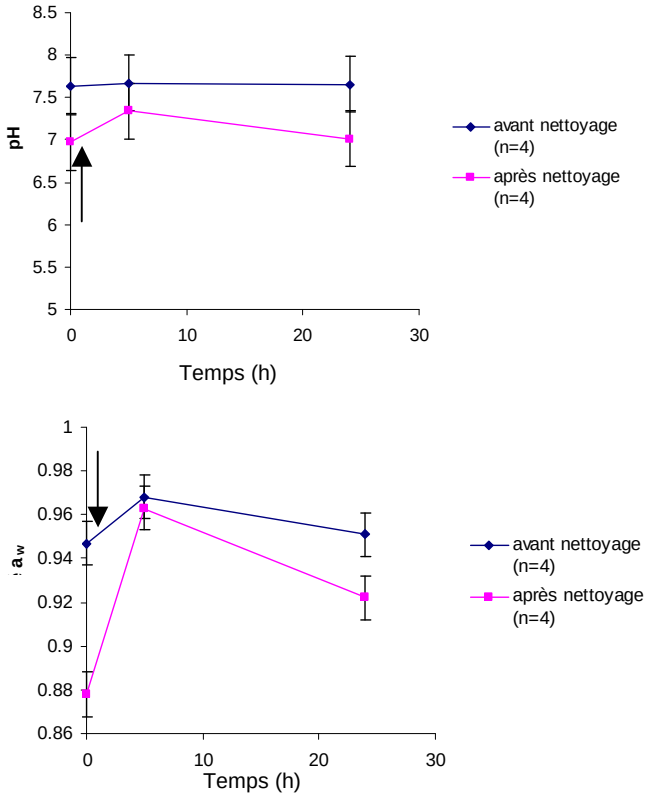


Figure III.7. Evolution des paramètres physicochimiques (pH et a_w) des échantillons de planches aux stades avant et après nettoyage avant le dépôt des 2 ml de TSB 1/20ème (flèche), à 5 h après le dépôt (après absorption des 2 ml par la planche), et à 24 h après le dépôt. Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance ($P > 0,05$).

L'absence d'influence de la variabilité des paramètres physico-chimiques sur la croissance de *Listeria* a été vérifiée grâce à la caractérisation de la variabilité des paramètres physico-chimiques et son impact sur la croissance (Norme NF V01 009, 2006). La formule est détaillée dans l'annexe 4.

Les probabilités de croissance de *L. monocytogenes* à 15°C en fonction des conditions physicochimiques (pH et a_w) mesurées sur les échantillons de planches d'affinage à 0, 5 et 24 h sont représentées sur la Figure III.8. Elles ont été calculées grâce au logiciel Symprevius (Augustin *et al.*, 2005). Pour le stade fin d'affinage (avant nettoyage), la probabilité de croissance était supérieure à 90 % pour toutes les conditions de J-1 à J12. Par contre, pour le stade après nettoyage, à 0 h, la probabilité de croissance était inférieure à 10%, puis supérieure à 90% à 5h après le dépôt des 2 ml et entre 10 et 50% à 24 h. Le dépôt de 2 ml ne modifie pas l'influence des paramètres physico-chimiques sur la croissance de *Listeria* pour le stade fin d'affinage (avant nettoyage), alors qu'il diminue l'inhibition de croissance par les paramètres physico-chimiques pour le stade après nettoyage. Il serait particulièrement intéressant de comparer l'apport ponctuel des 2 ml du mode d'inoculation avec l'apport d'humidité régulier du fromage déposé sur la planche au stade après nettoyage.

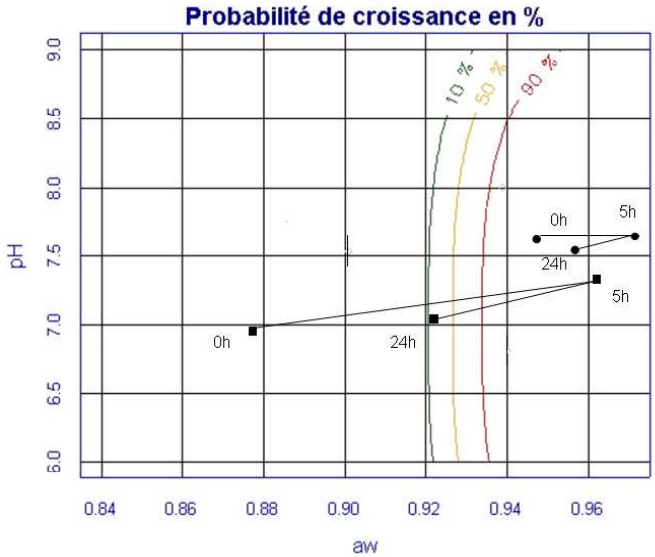


Figure III.8. Evolution des probabilités de croissance de *L. monocytogenes* à 15°C en fonctions des conditions physico-chimiques des échantillons de planches natives après nettoyage (■) et fin d'affinage (●) à 0, 5 et 24h (Symprevius, Augustin *et al.*, 2005). 0h : avant dépôt de 2ml de TSB 1/20ème. 5h : après observation visuelle de l'absorption des 2ml. Les lignes 10, 50 et 90% délimitent les zones où la probabilité de croissance de *Listeria* est supérieure au chiffre de la ligne (à droite) ou inférieure au chiffre (à gauche).

Ainsi, le mode d'inoculation choisi (2 ml sur 64 cm²) n'influence sans doute pas les probabilités de croissance de *L. monocytogenes* sur des planches au stade fin d'affinage, mais favorise certainement cette croissance sur des planches au stade après nettoyage par augmentation de l'a_w de la surface des planches, au dessus de l'a_w minimum de croissance de *L. monocytogenes*. Cet apport de liquide pour inoculer *L. monocytogenes* a néanmoins l'avantage de se rapprocher de l'échange d'humidité de la planche au stade après nettoyage avec le fromage et l'air humide des caves d'affinage.

2.1-2 Calcul de l'apport nutritionnel du TSB 1/20ème

Pour inoculer les *Listeria* sur les échantillons de planches, une solution de Tryptone Soja Bouillon (Biomérieux, Lyon, France) diluée au 20ème a été choisie, suite au calcul de l'apport nutritionnel sur les planches (Tableau III.3). Le TSB est en effet le milieu des pré-cultures de *Listeria*, et la dilution permet un apport nutritionnel inférieur aux nutriments déjà présents sur la planche décrits dans le chapitre précédent (Tableau II.12).

Tableau III.3. Evaluation de l'apport nutritionnel (mg/cm²) de la suspension d'inoculation (2 ml déposés sur 64 cm²).

Tryptone Soja Bouillon	pour 1 litre de TSB (g)	TSB1/20ème mg /cm²
Biotrypcase	17	$2,6\ 10^{-2}$
Biosoyase	3	$4,6\ 10^{-3}$
Glucose	2,5	$3,9\ 10^{-3}$
NaCl	5	$7,8\ 10^{-3}$
Phosphate bipotassique	2,5	$3,9\ 10^{-3}$

2.2 Etude de l'influence de l'autoclavage

L'influence de l'autoclavage sur le biotope de la surface des planches d'affinage a été déterminée, ainsi que les probabilités de croissance de *L. monocytogenes* dans le biotope

autoclavé. De même, les modifications des profils IRTF des surfaces des planches liées à l'autoclavage ont été évaluées.

2.2-1 Influence de l'autoclavage sur les paramètres physicochimiques (a_w, pH et humidité)

L'influence de l'autoclavage à 125°C pendant 15 min sur les conditions physico-chimiques de la surface des planches a été évaluée. Le pH, l'humidité et l'a_w ont été mesurés sur des échantillons de 2 planches aux 2 stades de prélèvement, natifs et autoclavés, avec 2 répétitions pour les 6 jours de suivi, soit un total de 48 résultats. Pour l'a_w, il y avait le double de planches, soit 96 résultats. Toutes ces planches avaient été utilisées pour l'affinage des fromages de l'origine C, pendant la saison printanière.

Les évolutions de l'a_w du pH et de l'humidité des échantillons natifs et autoclavés de planches d'affinage pendant 12 jours à 15°C et 98%HR sont représentés sur la Figure III.9. Pour l'a_w, la différence entre les stades de prélèvement disparaît après le dépôt des 2ml de TSB 1/20ème pour les échantillons natifs. Pour les échantillons autoclavés, cette différence disparaît après l'autoclavage. Pour l'humidité, l'évolution entre les 2 stades est parallèle pour les échantillons natifs avec un pic mesuré le lendemain du dépôt des 2 ml pour les échantillons natifs. Par contre, pour les échantillons autoclavés, après l'autoclavage, les valeurs d'humidité sont plus proches entre les stades. Pour les échantillons natifs, les valeurs de pH des 2 stades ont une évolution parallèle, avec une légère chute du pH au cours des 12 jours d'incubation. Pour les échantillons autoclavés, les valeurs de pH des échantillons de planches au stade fin d'affinage augmentent de manière non significative avec l'autoclavage. Par comparaison des valeurs d'humidité mesurées sur les échantillons au laboratoire avec les valeurs mesurées sur planches en caves (Figure II.4 du chapitre 2), les échantillons au stade après nettoyage (natifs et autoclavés) n'ont pas la même évolution. En cave, l'humidité des planches augmente d'environ 30% en 5 jours (de 24 à 56%), alors qu'au laboratoire, l'humidité des échantillons augmente de 20% en 5 jours (de 41 à 61%). Les apports d'humidité du mode d'inoculation en laboratoire et du fromage en caves font évoluer l'humidité des planches vers des taux d'humidité voisins.

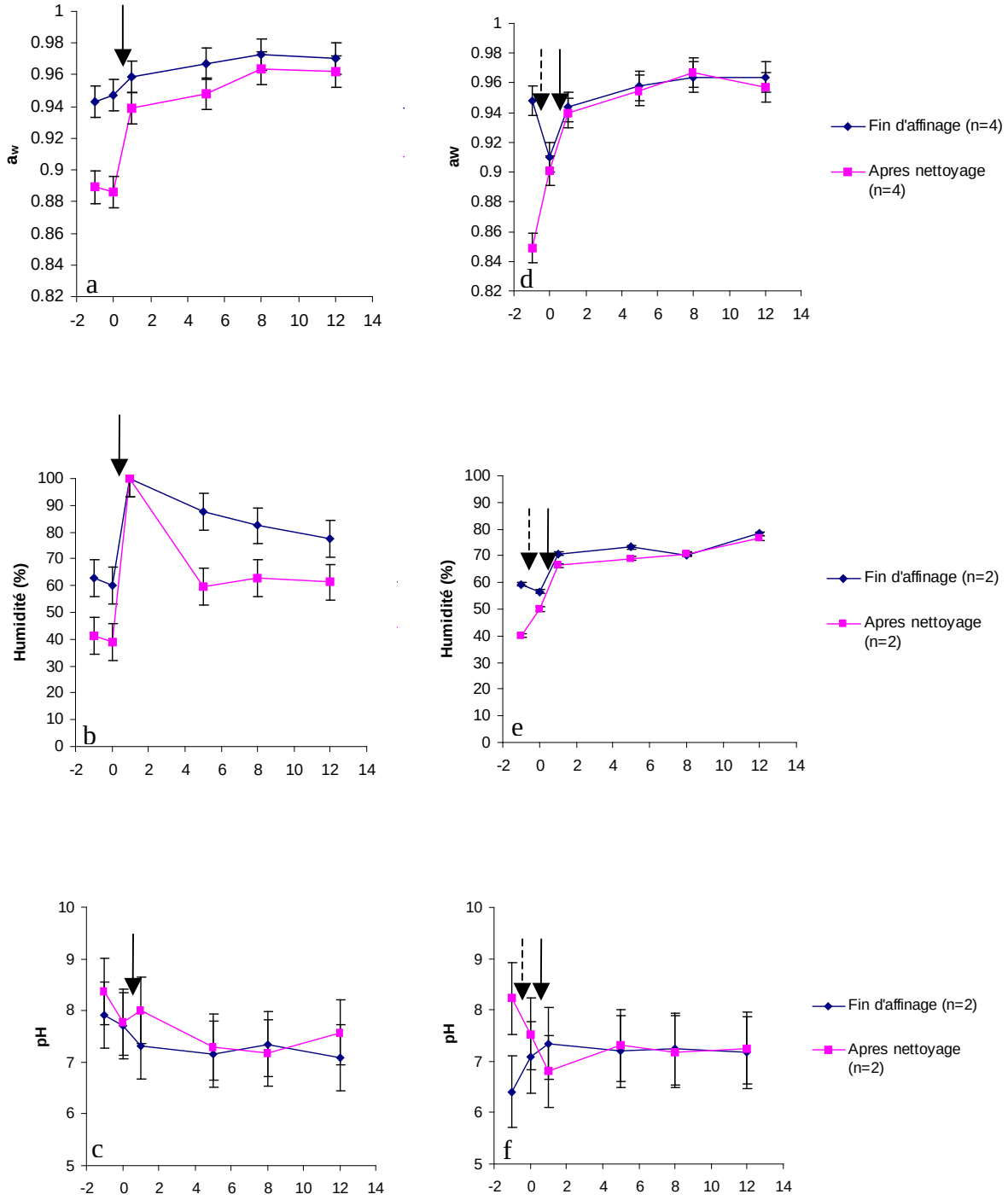


Figure III.9. Evolution de l'a_w (a), de l'humidité (b) et du pH (c) mesurés sur les échantillons natifs (a, b, c) et autoclavés (d, e, f) de planches d'affinage au stade après nettoyage et fin d'affinage (avant nettoyage), pendant 12 jours à 15°C et 98% HR. J-1 : jour du sciage. Autoclavage entre J-1 et J0 (flèche en pointillés). J0 : jour du dépôt de 2ml de TSB (1/20ème) (flèche pleine), mesure effectuée 5 heures après. Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance ($P < 0,05$).

Lorsque l'évolution de l'humidité des échantillons natifs après nettoyage (Figure III.9 b) de planches en laboratoire est comparée avec celle mesurée directement en cave d'affinage sur 3 planches (3 origines différentes, A, D, L), avec 3 répétitions pour les 5 jours de suivi (Figure II.4), les humidités à 0 et 5 jours sont comparables, mais l'apport des 2 ml entraîne un pic qui différencie les évolutions en laboratoire et en cave.

L'absence d'influence de la variabilité des paramètres physico-chimiques sur la croissance de *Listeria* a été vérifiée grâce à la caractérisation de la variabilité des paramètres physico-chimiques et son impact sur la croissance (Norme NF V01 009, 2006). La formule est détaillée dans l'annexe 4.

Les probabilités de croissance de *L. monocytogenes* en fonction des conditions physicochimiques (pH et a_w) mesurées sur les échantillons natifs et autoclavés de planches d'affinage pendant les 12 jours d'incubation à 15°C sont représentées sur la Figure III.10 (Symprevius). Pour le stade fin d'affinage, la probabilité de croissance était supérieure à 90 % pour toutes les conditions de J-1 à J12 pour les échantillons natifs. Pour les échantillons au stade fin d'affinage autoclavés, les probabilités de croissance sont supérieures à 90% dans tous les cas sauf à J0, après autoclavage, à cause d'une valeur d'a_w trop basse. Or, il a été démontré que le dépôt des 2 ml faisait remonter les probabilités de croissance (Figure III.7), ce qui est confirmé avec une probabilité de croissance supérieure à 90% à J1. Donc, pour le stade fin d'affinage, les paramètres physicochimiques des échantillons natifs et autoclavés de planches sont favorables à la croissance de *L. monocytogenes*.

Au stade après nettoyage, pour les paramètres physico-chimiques des échantillons natifs et autoclavés à J-1 et J0, les probabilités de croissance étaient inférieures à 10%. Par contre, suite au dépôt des 2 ml, les probabilités de croissances sont devenues supérieures à 90%. Tout comme pour le stade fin d'affinage, les paramètres physicochimiques des échantillons natifs et autoclavés de planches sont favorables à la croissance de *L. monocytogenes*.

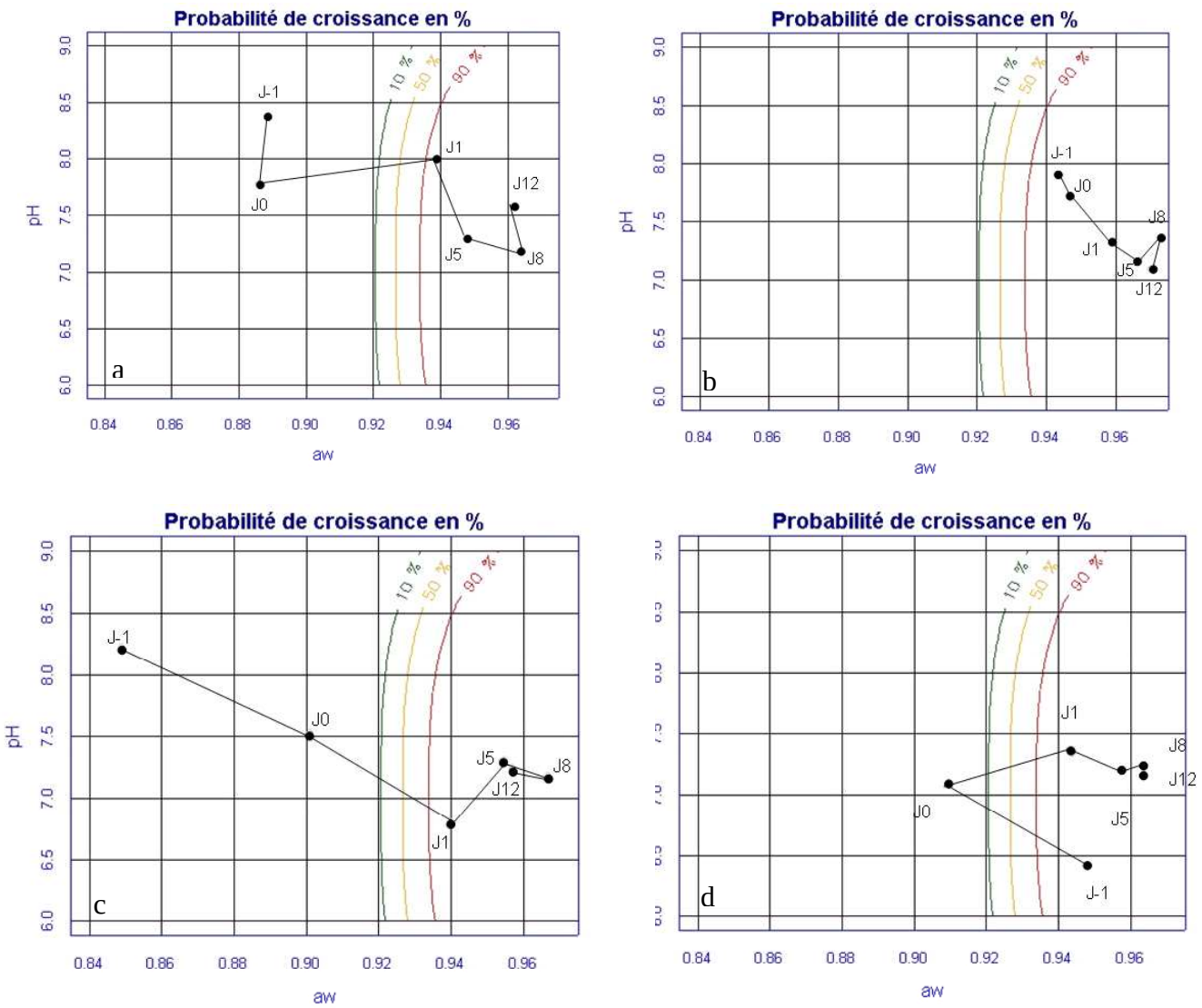


Figure III.10. Probabilités de croissance de *L. monocytogenes* à 15°C en fonction des conditions physicochimiques mesurées de J-1 à J12 sur les échantillons natifs après nettoyage (a) et fin d'affinage (b) et, autoclavés après nettoyage (c) et fin d'affinage (d) (Symprevius, Augustin *et al.*, 2005). Les lignes 10, 50 et 90% délimitent les zones où la probabilité de croissance de *Listeria* est supérieure au chiffre de la ligne (à droite) ou inférieure au chiffre (à gauche).

Ainsi, dans le cadre des expérimentations au laboratoire, l'autoclavage ne modifie pas les valeurs de pH et d'a_w de surface des planches d'affinage. Les comportements de *L. monocytogenes* ne sont sans doute pas influencés par les modifications des paramètres physico-chimiques de surface des planches liées à l'autoclavage.

Par contre, il serait particulièrement intéressant d'obtenir ces courbes de probabilité de croissance avec les paramètres physico-chimiques mesurés directement en cave. En effet, l'augmentation de l'humidité apportée par les fromages en cave d'affinage apparaît plus régulière qu'avec l'apport des 2 ml (Figure II.4 du chapitre 2). L'a_w pourrait donc aussi progresser plus lentement et induire des probabilités de croissance de *Listeria* plus faibles pour les premiers jours entre le fromage et la planche au stade après nettoyage. Ces conditions expérimentales sont donc plus favorables pour la croissance de *L. monocytogenes* pour le stade après nettoyage que les conditions en caves.

Ainsi, l'autoclavage, associé au dépôt de 2 ml, conserve les conditions physico-chimiques du biotope favorables à la croissance de *L. monocytogenes* pour le stade fin d'affinage. Pour le stade après nettoyage, les modalités expérimentales modifient le biotope qui devient favorable à la croissance de *L. monocytogenes*.

2.2-2 Influence de l'autoclavage sur les profils IRTF des planches

La Figure III.11 représente les spectres IRTF normalisés des échantillons natifs et autoclavés d'une planche de fin d'affinage pour les zones des protéines (1780-1485 cm^{-1}), mixte (1485-1180 cm^{-1}) et des sucres (1180-920 cm^{-1}). Une étude bibliographique et les spectres IRTF de témoin identifiés réalisés au laboratoire ont permis les attributions des bandes des spectres IRTF des planches. Cette attribution des bandes a été réalisée à partir des dérivées secondes des spectres (Tableaux II.13 et II.14). Différents pics ont pu être identifiés pour les spectres de la Figure III.12 : 1645 cm^{-1} (amide I et bois), 1544 cm^{-1} (amide II et matière grasse fromagère), 1459 cm^{-1} (protéines, lipides, lignine), 1406 cm^{-1} (protéines, groupes COOH), 1244 cm^{-1} (acides nucléiques et phospholipides), 1157 cm^{-1} (glucose, esters, cellulose et hémicellulose), et 1036 cm^{-1} (glycogène, polysaccharides et mananes). Le pic à 1315 cm^{-1} n'a pas pu être attribué. La similarité des profils (allure et absorbance) pour les spectres des échantillons natif et autoclavé est notable pour l'ensemble des spectres. Les pics identifiés sont en effet identiques pour les spectres des échantillons natifs et autoclavés. Les planches autoclavées et non autoclavées ont donc une composition moléculaire globale proche ou identique.

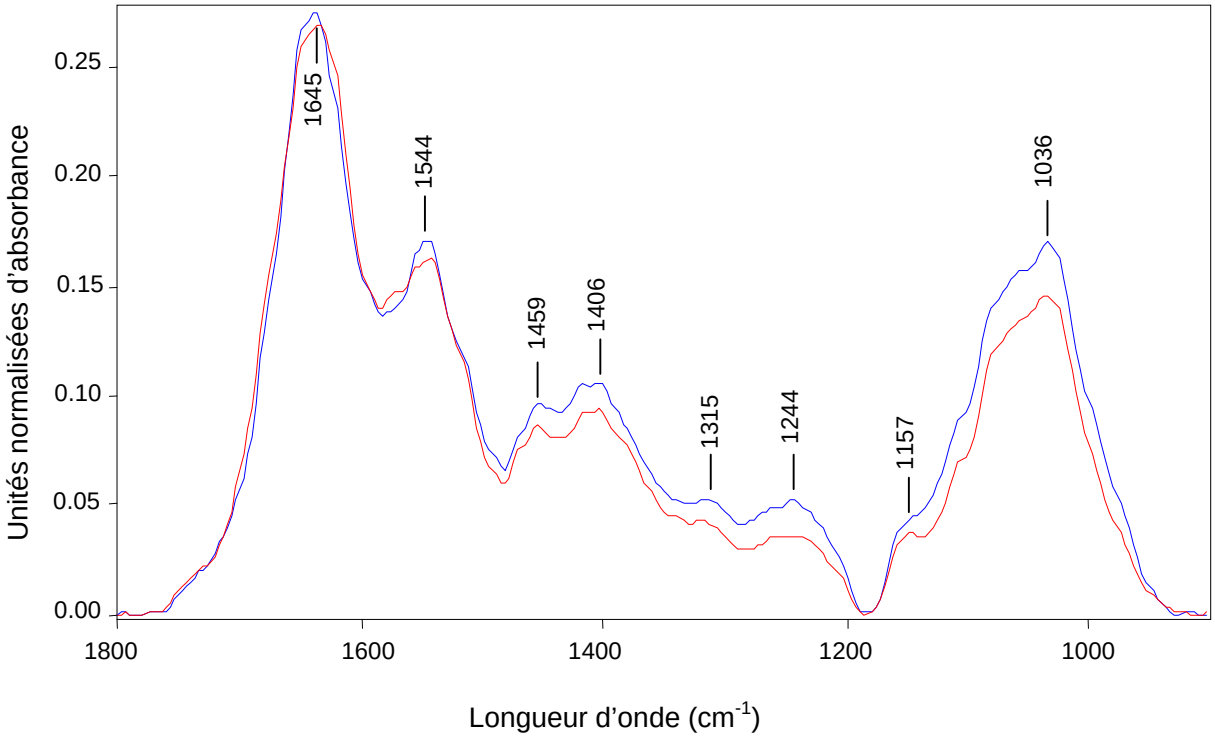


Figure III.11. Spectres IRTF normalisés d'échantillons de planches d'affinage de fin d'affinage, natif (bleu) et autoclavé (rouge).

L'autoclavage n'entraîne pas de modifications de la composition moléculaire de la surface des planches. Selon les modalités expérimentales, les conditions physico-chimiques sont favorables à *L. monocytogenes* ainsi le mode d'inoculation par dépôt de 2 ml pourrait minimiser un effet anti-*Listeria* potentiel des basses valeurs d'a_w mesurées sur des planches au stade après nettoyage.

2.3 Influence du mode d'inoculation et du mode d'incubation sur les microflores du consortium présentes sur les planches d'affinage

Suite à l'influence des modalités expérimentales sur le biotope, l'influence des modes d'inoculation et d'incubation sur les microflores du consortium doit être aussi évaluée.

Pour suivre les populations des microflores présentes sur les planches d'affinage, les consortia de 2 planches (origine C) aux 2 stades de prélèvement ont été prélevés à J0, J1, J5, J8 et J12, soit un total de 20 consortia, prélevés au printemps. A J0, 2 ml de TSB 1/20ème était déposé sur chaque

échantillon pour simuler une inoculation. Les évolutions des flores présentes sur les planches d'affinage aux stades après nettoyage et fin d'affinage sont représentées sur la Figure III.12 et les Tableaux III.4 et III.5. La FMAR et les bactéries corynéformes étaient stables, comprises entre 7 et 8 Log(UFC/cm²), aux 2 stades de prélèvement. La flore acidifiante mésophile et les levures et moisissures étaient entre 6 et 4 Log(UFC/cm²) pour le stade après nettoyage et entre 7 et 6 Log(UFC/cm²) pour le stade fin d'affinage. Les populations des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs, des coliformes et des staphylocoques à coagulase positive sont restées inférieures au seuil de détection de 1,48 Log(UFC/cm²). Les dénombrements des entérocoques étaient toujours inférieurs à 1,48 Log(UFC/cm²), sauf pour 3 dénombrements de 1,78 Log(UFC/cm²) pour J5, J8 et J12 du stade fin d'affinage. Les dénombrements des staphylocoques spp. sont restés compris entre 2,08 et 3,12 Log(UFC/cm²) pour le stade fin d'affinage et entre moins de 1,48 et 2,25 Log(UFC/cm²) pour le stade après nettoyage. Au stade fin d'affinage, tous les dénombrements des leuconostocs étaient inférieurs à 3,48 Log(UFC/cm²) et compris entre moins de 1,48 et 3,08 Log(UFC/cm²) au stade après nettoyage. Enfin, 8 dénombrements sur 10 de *Pseudomonas* spp étaient inférieurs à 3,48 Log(UFC/cm²), et à J8, à 4,08 et 3,78 Log(UFC/cm²) aux 2 stades de prélèvement

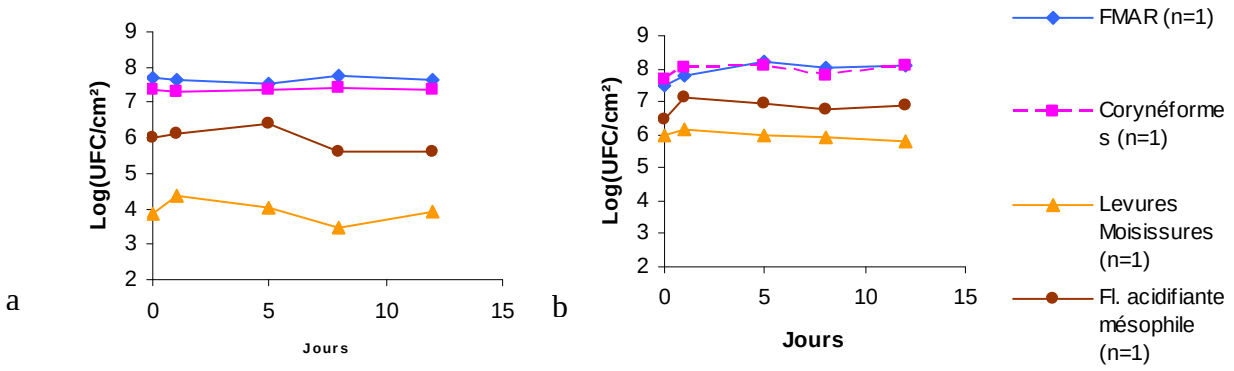


Figure III.12. Evolution des principales flores présentes sur les échantillons de planches d'affinage au stade après nettoyage (a) et fin d'affinage (b), pendant 12 jours à 15°C et 98%HR

Tableau III.4. Evolution des flores minoritaires présentes sur les planches d'affinage de fin d'affinage pendant 12 jours à 15°C et 98% HR.

Fin d'affinage Log(UFC/cm²)	Leuconostocs	Lactobacilles HF	Entérocoques	Staphylocoques spp	Staphylocoques à coagulase +	*Pseudomonas* spp	Coliformes
J0 (n=1)	<3,48	<1,48	<1,48	2,08	<1,48	<3,48	<1,48
J1 (n=1)	<3,48	<1,48	<1,48	2,08	<1,48	<3,48	<1,48
J5 (n=1)	<3,48	<1,48	1,78	3,12	<1,48	<3,48	<1,48
J8 (n=1)	<3,48	<1,48	1,78	2,25	<1,48	4,08	<1,48
J12 (n=1)	<3,48	<1,48	1,78	2,73	<1,48	<3,48	2,08

Tableau III.5. Evolution des flores minoritaires présentes sur les planches d'affinage au stade après nettoyage, pendant 12 jours à 15°C et 98% HR.

Après nettoyage Log(UFC/cm²)	Leuconostocs	Lactobacilles HF	Entérocoques	Staphylocoques spp	Staphylocoques à coagulase +	*Pseudomonas* spp	Coliformes
J0 (n=1)	3,08	<1,48	<1,48	1,78	<1,48	<3,48	<1,48
J1 (n=1)	<1,48	<1,48	<1,48	2,25	<1,48	<3,48	<1,48
J5 (n=1)	3,1	<1,48	<1,48	<1,48	<1,48	<3,48	<1,48
J8 (n=1)	2,38	<1,48	<1,48	2,25	<1,48	3,78	<1,48
J12 (n=1)	<1,48	<1,48	<1,48	1,78	<1,48	<3,48	<1,48

Pour conclure, pendant les 12 jours d'incubation à 15°C et 98% HR, toutes les populations des flores dénombrées n'ont pas montré d'évolution majeure. Les modes d'inoculation et d'incubation n'influencent donc pas les dénombrements des microflores de surface des planches. L'absence de croissance pour toutes les flores malgré des paramètres physico-chimiques favorables à la croissance laisse supposer une carence nutritionnelle importante sur les échantillons de planches incubés à 15°C au laboratoire.

Ainsi, les modalités expérimentales d'inoculation, d'autoclavage et d'incubation des échantillons des planches rendent ou conservent les conditions physico-chimiques (pH et a_w) du biotope de surface des planches favorables à la croissance de *L. monocytogenes*. Les microflores du consortium ne sont pas influencées par ces mêmes modalités expérimentales.

3. Etude du comportement des *Listeria* inoculées sur les planches d'affinage en laboratoire

Le comportement de *L. monocytogenes* sur les planches est détaillé dans cette partie en distinguant les planches natives et autoclavées, les planches à 2 stades (fin d'affinage et après nettoyage), les origines des fromages affinés sur les planches et le taux d'inoculation de *L. monocytogenes*.

3.1 Vérification de l'absence de *L. monocytogenes* sur les planches avant l'inoculation

La présence de *L. monocytogenes* sur les planches avant l'inoculation a été recherchée soit dans les suspensions de décrochage issues de 8 planches, soit par enrichissement direct d'un échantillon de planche dans un bouillon Fraser (Biokar) pour 15 planches. Pour ces 23 planches, la présence de *L. monocytogenes* n'a pas été mise en évidence.

3.2 Comportement des 2 souches de *L. monocytogenes* inoculées sur des planches d'affinage.

Dans un premier temps, le comportement de *L. monocytogenes* sur planches d'affinage native et autoclavée a été étudié pendant 12 jours en comparant les effets de 2 états du biofilm (natif et autoclavé), après l'affinage de fromages issus de 4 origines (A, B, C et H), avec 2 souches de *L. monocytogenes* (162 et 481) à 2 durées d'incubation (J1 et J12). Avec 2 répétitions pour chaque cas, le total des résultats s'élevait à 64 pour un total de 8 planches prélevées pendant la saison automnale. Le taux d'inoculation était de 10^3 UFC/cm², les planches étaient au stade après nettoyage. Aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence pour les 2 souches de *L. monocytogenes* sur les biofilms natifs ou autoclavés en fonction de l'origine des fromages affinés sur les planches étudiées (Tableau III.6). Les comportements des 2 souches de *L. monocytogenes* sur des biofilms natifs et autoclavés au stade après nettoyage après 1 et 12 jours d'incubation sont résumés sur la Figure III.13. Des croissances de 3,40 et 4,14 Log(UFC/cm²) pour les 2 souches 162 et 481 ($P < 0,05$) ont été observées sur les planches autoclavées, sans biofilm vivant, après 12 jours d'incubation. A l'inverse, la souche 481 a subi une décroissance de 1,85 Log(UFC/cm²) ($P < 0,05$) sur les planches natives après 12 jours

d'incubation. Pour la souche 162, le dénombrement à J1 sur biofilm natif (0,38 Log(UFC/cm²)) était déjà significativement inférieur au dénombrement de cette même souche sur biofilm autoclavé (3,71 Log(UFC/cm²), P < 0,05). Aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence entre les dénombrements sur biofilm natif à J1 et J12 (0,38 et 0,62 Log(UFC/cm²), P < 0,05) pour la souche 162.

Tableau III.6. Analyse de variance du comportement de *L. monocytogenes* sur planches d'affinage native et autoclavée, après l'affinage de fromages issus de 4 origines (A, B, C et H), avec 2 souches de *L. monocytogenes* (162 et 481) à 2 durées d'incubation (J1 et J12).

Facteurs	**Log(UFC/cm²)**
Moyenne ± *et*[1]	3.31±*0.12*
Producteur	NS[2]
A	*3.52±0.24*
B	*3.40±0.24*
C	*3.05±0.24*
D	*3.27±0.24*
Souche	**[3]
AE	*2.95±0.17 a*
S	*3.66±0.17 b*
Jour	***[4]
J1	*2.57±0.17 b*
J12	*4.05±0.17 a*
Consortium	***[4]
natif	*1.26±0.17 a*
autoclavé	*5.35±0.17 b*
Interactions	
Souche x Consortium	**[3]
Jour x Consortium	***[4]

[1] et : erreur type

[2] NS : Non significatif

[3] P < 0,01

[4] P < 0,001

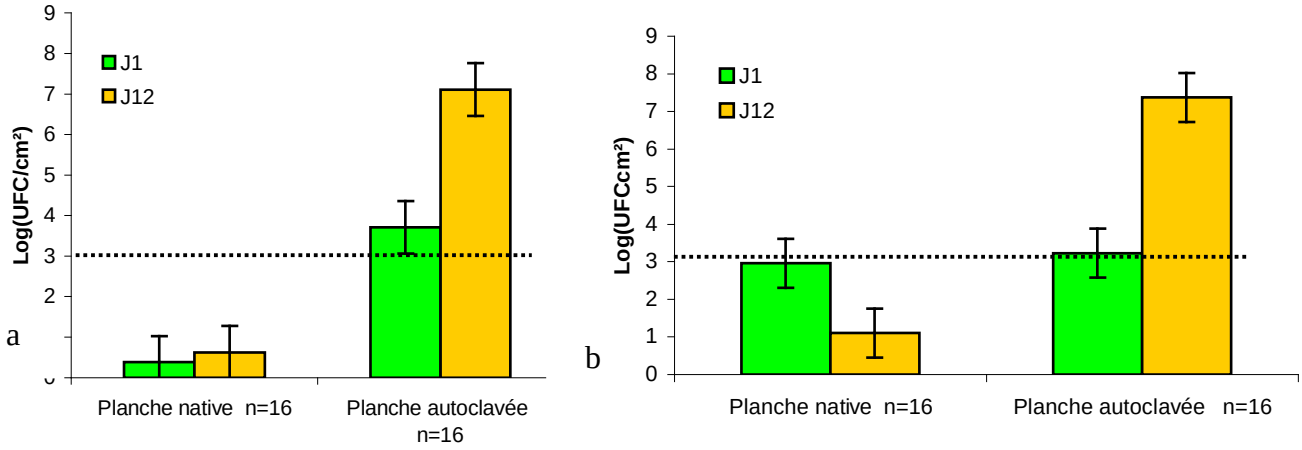


Figure III.13. Comparaison entre les évolutions des souches de *L. monocytogenes* 162 (a) et 481 (b) sur des échantillons natifs et autoclavés de planches au stade après nettoyage pour 4 origines différentes et 2 répétitions, après 1 et 12 jours d'incubation (Log(UFC/cm²)). Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance (P < 0,05). La ligne en pointillés correspond au taux d'inoculation à J0 (3 Log(UFC/cm²)).

Le comportement de *Listeria* à 5 et 24h a aussi été étudié dans les mêmes conditions : 2 souches de *Listeria* (162 et 481), 2 états du biofilm (natif et autoclavé), avec un taux d'inoculations à 10^3 UFC/cm², des planches après nettoyage (origine C), et 3 répétitions. Ces résultats (24, obtenus sur 3 planches) ont été comparés avec les dénombrements des suspensions d'inoculation. Les comportements des 2 souches 162 et 481 sur biofilms natifs et autoclavés dans les 24 h suivant l'inoculation sont résumés sur la Figure III.14. Pour la souche 162, les dénombrements des suspensions de décrochage des biofilms natifs et autoclavés après 5h d'incubation (1,62 et 2,04 Log(UFC/cm²), étaient significativement inférieurs à la suspension d'inoculation (3,06 Log(UFC/cm²), P < 0,05). Après 24h d'incubation, la population de *L. monocytogenes* 162 sur planche native a diminué de 1,44 Log(UFC/cm²) (P < 0,01) alors que, sur planche autoclavée, elle a augmenté significativement de 2,21 Log(UFC/cm²) (P < 0,01). Pour la souche 481, après 5h d'incubation, aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence entre les dénombrements des suspensions de décrochage prélevées sur planches native et autoclavée et la suspension d'inoculation (2,69, 2,83 et 3,17 Log(UFC/cm²), P > 0,05). Après 24 h d'incubation, la population de *Listeria* sur biofilm autoclavé a significativement augmenté

(1,63 Log(UFC/cm²), P < 0,01), alors que la population de *Listeria* sur biofilm natif n'a pas évolué entre 5 et 24h d'incubation (2,69 et 2,31 Log(UFC/cm²), P > 0,05).

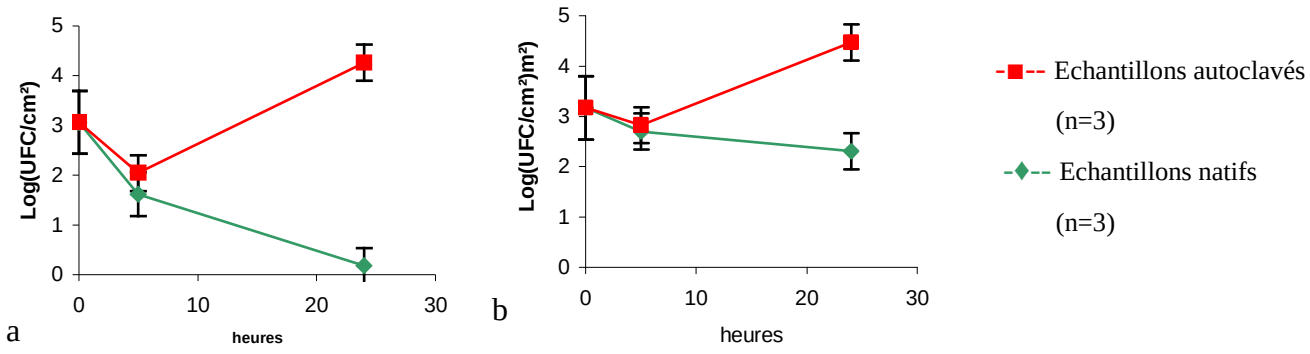


Figure III.14. Comparaison des évolutions des souches de *Listeria* 162 (a) et 481 (b) sur des planches natives et autoclavées dans les premières 24h après l'inoculation (Log(UFC/cm²)). Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance (P < 0,05). 0h : dénombrement de la suspension d'inoculation. 5 et 24h : dénombrement de la suspension de décrochage.

Ces expériences démontrent clairement l'effet anti-*Listeria* des planches d'affinage avec un biofilm vivant en comparaison avec la croissance de *Listeria* sur les planches autoclavées, dans les premières 24 h et après 12 jours d'incubation. Cet effet anti-*Listeria* semble être un effet inhibiteur de la croissance de *Listeria*. La croissance importante des *Listeria* sur les planches autoclavées contraste avec l'effet anti-*Listeria* du biofilm natif. L'autoclavage (125°C pendant 15 min) peut modifier l'écosystème de la surface de la planche par inactivation du consortium ou par modification de substances. L'absence d'effet anti-*Listeria* sur les planches autoclavées peut donc être lié à l'absence d'effet barrière du consortium ou la dégradation de substances inhibitrices. Parallèlement aux travaux développés pour le reblochon, une comparaison de croissance de *L. monocytogenes* inoculées sur des échantillons de planches de l'AOC « Munster » au stade fin d'affinage, ayant subi une ionisation ou un autoclavage, a été réalisée par Aérial dans le cadre du programme ACTIA n°03.27. L'ionisation est un traitement stérilisant de surface à froid, pouvant entraîner des modifications éventuelles (oxydation), mais sans modification liée à la vapeur d'eau chaude. Ces essais dans les conditions d'étude ne révèlent pas de différence significative de dénombrement de *L. monocytogenes* après une incubation de 15 jours à 15°C pour les planches ionisées et autoclavées. A J15, les dénombrements de la souche

162 de *L. monocytogenes* étaient de 6,0 et 5,9 Log(UFC/cm²) sur les planches ionisées et autoclavées (125°C, 15 min), et pour la souche 481, de 5,2 et 5,0 Log(UFC/cm²) (résultats non présentés dans ce travail de thèse). C'est l'action stérilisante de surface qui est commune à l'autoclavage et à l'ionisation. **L'effet anti-*Listeria* des planches d'affinage est donc lié à la présence du biofilm « vivant » à la surface des planches.** La disparition de l'effet inhibiteur après autoclavage des planches peut s'expliquer par la suppression de la partie vivante du biofilm, mais aussi par les substances nutritives supplémentaires issues de cellules mortes.

Ce résultat est en accord avec les études de Carminati *et al*. (1999, 2000), qui suggèrent que la présence d'un complexe microbien riche à la surface des fromages pourrait aider à contrôler les contaminations de *Listeria* et les contaminations croisées avec l'environnement, et notamment les planches d'affinage en bois. Dans la dernière étude de Carminati *et al*. (2000), les planches en bois avaient été préalablement décontaminées (eau de Javel, 200 ppm, 30 min), ce qui s'approche de notre témoin « planche sans activité microbiologique ». Il serait intéressant d'évaluer les contaminations croisées sur des planches avec la flore d'affinage native. De nombreux auteurs ont déjà suggéré la difficulté de *Listeria* à se développer sur des biofilms et plusieurs mécanismes ont été décrits. Tout d'abord, Meylheuc *et al.* (2006) ont montré que des surfaces recouvertes de biosurfactants produits par des bactéries isolées dans le milieu agro-alimentaire, *Pseudomonas fluorescens* (flore de surface de feuille de salade) et *Lactobacillus helveticus* (utilisé pour la production de fromage à pâte pressée cuite) réduisaient l'adhésion de germes indésirables tels que *Listeria monocytogenes*. Ensuite, la synthèse de molécules inhibitrices par *Lactococcus lactis* (nisine) ou par un consortium complexe d'affinage de fromage (pédiocine) engendre une décroissance de la population de *Listeria* sur une surface d'acier inoxydable et sur les fromages (Leriche *et al*., 1999 ; Loessner *et al*., 2002). Le pH et les composés acides de type acétate ou lactate, spécifiquement les formes indissociées, peuvent aussi participer au mécanisme d'inhibition de *Listeria* dans les fromages (Millet *et al*., 2005). Enfin, la compétition entre bactéries est aussi un mécanisme d'inhibition. Ainsi, la présence des flores compétitives peut induire un ralentissement de la croissance de *Listeria* (Jeong et Franck, 1994), ou une réduction considérable de ce pathogène (Zhao *et al*., 2006). Gnanou Besse *et al*. (2006) ont montré un "effet Jameson", décrit par Cornu *et al*. (2001), en étudiant l'évolution de la population de *Listeria* dans du saumon fumé. Cet effet désigne l'arrêt simultané de la

croissance de toutes les flores, lorsque la population bactérienne dominante atteint la phase stationnaire. Ce phénomène est attribué à une compétition nutritionnelle.

Cette étude a aussi mis en évidence une différence entre les comportements des 2 souches de *L. monocytogenes* depuis l'inoculation jusqu'à la fin de l'incubation. Après 5h d'incubation, il n'y avait pas de différence entre la suspension d'inoculation et les suspensions de décrochage pour la souche 481, alors que cette différence était significative pour la souche 162 ($P < 0,05$). En l'absence d'effet des ultrasons sur la cultivabilité des 2 souches de *L. monocytogenes* (Figure III.6), cette différence de comportement pourrait être expliquée par une différence de force d'attachement de chaque souche et donc d'efficacité de décrochage, qui a déjà été décrite par Chae *et al*. (2001), avec des chiffonnettes. Les 2 taux de décrochage étaient de 93-99% et de 90-96% pour 2 souches de *L. monocytogenes* cultivées pendant 10 jours à 37°C sur des lames de verre. Ces différences d'efficacité de décrochage ne permettent pas des comparaisons uniquement entre les dénombrements de suspension de décrochage d'une même souche.
Néanmoins, une inhibition significative a été observée entre 5 et 24 h d'incubation pour la souche 162 au stade après nettoyage, alors que l'inhibition n'est survenue qu'entre 1 et 12 jours d'incubation pour la souche 481. L'inhibition était donc plus précoce pour la souche 162 que pour la souche 481. La souche 162 apparaît donc plus sensible à l'effet inhibiteur des planches d'affinage.

Un effet inhibiteur des planches d'affinage sur l'implantation et le développement de *L. monocytogenes* a donc été démontré, pour les 2 souches de *L. monocytogenes* sélectionnées pour cette étude. Cet effet inhibiteur est lié à l'activité biologique du microbiote natif des planches.

3.3 Influence de l'origine des fromages et du stade de prélèvement des planches d'affinage sur le comportement des 2 souches de *L. monocytogenes*.

Dans un deuxième temps, l'influence du stade de prélèvement des planches d'affinage sur l'effet inhibiteur vis à vis de *L. monocytogenes* est déterminée ainsi que l'influence de l'origine des fromages.

3.3-1 Suivi du comportement de *L. monocytogenes* après 1 et 12 jours d'incubation en fonction de l'origine des fromages et du stade de prélèvement des planches

L'influence de l'origine des fromages (A, B, C et H) et du stade de prélèvement (avant et après) sur 2 souches de *L. monocytogenes* ont été évalués à 2 durées d'incubation (J1 et J12). Avec 2 répétitions pour chaque cas, le total des résultats s'élevait à 64 pour un total de 8 planches prélevées au printemps et à l'automne. Le taux d'inoculation était de 10^3 UFC/cm². Aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence en fonction des origines des fromages affinés sur les planches analysées (A, B, C et H) ($P > 0,05$) (Figure III.15). Ce résultat est à relier avec l'absence d'influence de l'origine des fromages sur les flores majoritaires du biofilm décrite dans le chapitre précèdent : bactéries corynéformes (~7 Log(UFC/cm²)), *Geotrichum candidum* (~6 Log(UFC/cm²)), et la FMAR (~7,5 Log(UFC/cm²)). En effet, pour les biofilms des planches de fin d'affinage (avant nettoyage), les origines des fromages se distinguaient uniquement par les flores minoritaires (staphylocoques, leuconostocs, lactobacilles hétérofermentaires facultatifs, entérocoques et *Pseudomonas*). Ainsi, les flores minoritaires ne semblent pas jouer un rôle dans l'effet anti-*Listeria* au stade fin d'affinage. Il est donc très probable que la biomasse de la flore dominante soit à l'origine du mécanisme d'inhibition, par compétition nutritionnelle.

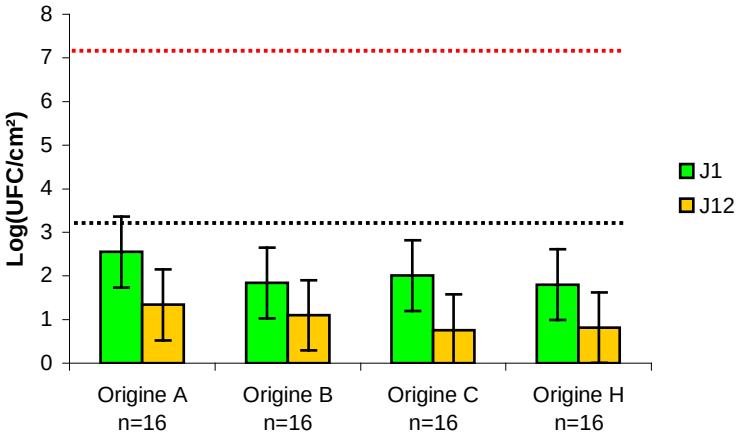


Figure III.15. Effet de l'origine des fromages sur les dénombrements (Log(UFC/cm²)) des 2 souches de *L. monocytogenes* décrochés des planches d'affinage après 1 et 12 jours d'incubation (moyenne pour 2 stades de prélèvement et 2 répétitions). La ligne noire en pointillés correspond au taux d'inoculation de *L. monocytogenes*. La ligne rouge en pointillés correspond au dénombrement à J12 de *L. monocytogenes* sur une planche autoclavée pour une inoculation de 3 Log(UFC/cm²). Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance ($P < 0,05$).

Les comportements des 2 souches de *L. monocytogenes* sur les planches aux 2 stades de prélèvement sont résumés sur la Figure III.16. La population de la souche 162 à J1 sur la planche après nettoyage (0,38 Log(UFC/cm²)) était significativement moins importante que la population de cette même souche sur planche fin d'affinage (2,27 Log(UFC/cm², P < 0,01). A l'inverse, à J12, aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence entre les planches fin d'affinage et après nettoyage (0,72 et 0,62 Log(UFC/cm²), P < 0,05). La chute de population de la souche 162 de 1,55 Log(UFC/cm²) (P < 0,01) entre J1 et J12 pour les planches fin d'affinage était aussi importante à noter. Pour la souche 481, aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence entre les dénombrements des planches fin d'affinage et après nettoyage à J1 et J12 (P < 0,05). Une chute de population de 1,84 Log(UFC/cm²) (P < 0,01) a été observée après 12 jours d'incubation sur les planches après nettoyage. En conclusion, pour la souche 162, l'effet anti-*Listeria* est survenu plus tôt pour le stade après nettoyage, dans les 1ères 24h d'incubation. L'effet anti-*Listeria* est survenu pour le stade fin d'affinage entre 1 et 12 jours d'incubation. Pour la souche 481, l'effet anti-*Listeria* est survenu pour les 2 stades entre 1 et 12 jours d'incubation, il était plus important pour le stade après nettoyage mais non significativement.

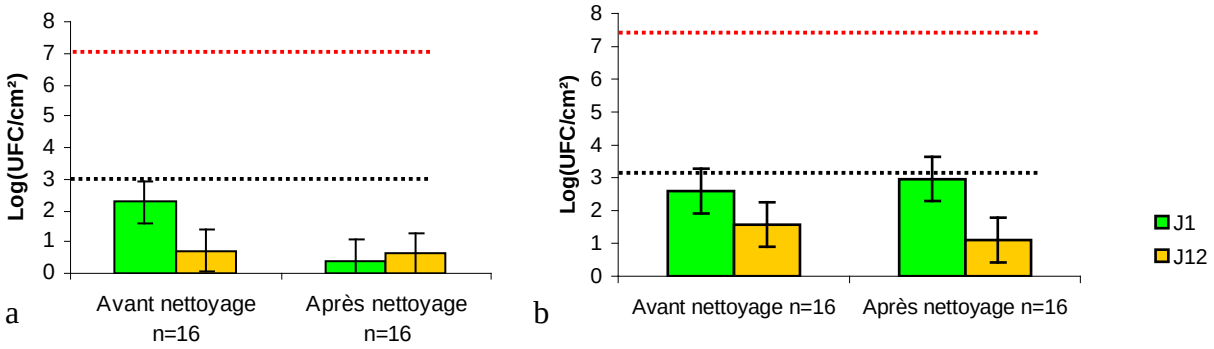


Figure III.16. Comparaison des évolutions des souches de *Listeria* 162 (a) et 481 (b) sur des planches avant nettoyage (fin d'affinage) et après nettoyage (moyenne des 4 origines et des 2 répétitions), après 1 et 12 jours d'incubation. (Log(UFC/cm²)). La ligne noire en pointillés correspond au taux d'inoculation. La ligne rouge en pointillés correspond au dénombrement à J12 de *L. monocytogenes* sur une planche autoclavée pour une inoculation de 3 Log(UFC/cm²). Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance (P < 0,05).

Des différences d'inhibition de *Listeria* entre les stades d'affinage ont aussi été observées dans l'étude de Carminati (1999). En effet, les impacts sur *Listeria* de 2 consortia microbiens à la surface de fromages à 3 stades d'affinage ont été testés. Les différences d'inhibition observées entre les stades d'affinage étaient principalement dues à des différences de pH et de dénombrement de la population totale. La croissance de *Listeria* était en effet favorisée par des faibles populations de microflores de surface et inhibée par des valeurs de pH basses.

Dans notre étude, les différences de comportement entre les 2 stades de prélèvement surtout pour la souche 162, laissent supposer des mécanismes de l'effet anti-*Listeria* différents soit pour le ou les mécanismes inhibiteurs, soit pour l'intensité de ceux-ci. Or, il a été montré précédemment que les paramètres physico-chimiques (pH et a_w) ont sans doute un rôle négligeable dans cet effet anti-*Listeria*. Le dénombrement d'une seule flore majoritaire, *Geotrichum candidum*, est par contre significativement modifié par le nettoyage. En effet, la population de *Geotrichum candidum* diminue d'environ 2 Log(UFC/cm²) après le nettoyage. Or, cette levure est connue pour inhiber *L. monocytogenes* par compétition nutritionnelle (Goerges *et al*, 2006) ou par synthèse de molécules ayant une activité anti-*Listeria* (Dieuleveux *et al*., 1998b). Son intervention dans l'effet anti-*Listeria* doit donc être moins importante au stade après nettoyage. Une autre différence entre les stades avant et après nettoyage est une diminution des composés moléculaires à la surface des planches, évaluée par spectroscopie IRTF. Cette diminution des nutriments pourrait renforcer le mécanisme de compétition nutritionnelle potentiel. Il est particulièrement intéressant de noter que l'effet anti-*Listeria* est plus important au stade après nettoyage, stade où le risque d'introduction des flores pathogènes dans les caves d'affinage est le plus important.

Ainsi, l'origine des fromages affinés sur les planches n'influence pas l'effet inhibiteur des planches sur *L. monocytogenes*, à la différence du stade de prélèvement des planches qui peut faire varier l'intensité de cet effet inhibiteur.

3.3-2 Cinétique du comportement de *L. monocytogenes* en fonction du stade de prélèvement des planches

L'influence du stade de prélèvement peut aussi être analysé par l'étude de la cinétique des populations de *L. monocytogenes* sur les planches d'affinage aux deux stades.

Les cinétiques des populations des 2 souches de *L. monocytogenes* (481 et 162) inoculées à 10^3 Log(UFC/cm²) sur les échantillons de 4 planches d'affinage aux stades après nettoyage et fin d'affinage (avant nettoyage) ont été réalisées au printemps. Elles sont représentées sur la Figure III.17. Les différences de comportement entre les 2 souches observées précédemment sont confirmées. La souche 162 est plus rapidement inhibée. En effet, la population de la souche 162 a chuté entre J1 et J5 de 1,3 Log(UFC/cm²) et 3,0 Log(UFC/cm²) respectivement pour les stades après nettoyage et fin d'affinage, au seuil de détection soit 0,18 Log(UFC/cm²). Pour les 2 stades, la population des *Listeria* 162 n'a pas évolué entre J5 et J12. Le dénombrement de la souche 162 à J1 pour le stade après nettoyage était plus important pour cette expérience (3 Log(UFC/cm²)) que lors du suivi entre J1 et J12 (0,38 Log(UFC/cm²)). Ceci suggère un effet anti-*Listeria* retardé du stade après nettoyage. Pour la souche 481, la population sur les échantillons de planches au stade après nettoyage est restée stable entre 2,3 et 3,1 Log(UFC/cm²), alors que ces populations diminuaient de 1,84 Log(UFC/cm²) au stade après nettoyage lors des comparaisons entre J1 et J12 (Figure III.16b). Pour le stade fin d'affinage, la population est restée stable entre 2,4 et 3,0 Log(UFC/cm²), pour chuter ensuite à 0,6 à J12 lors de la cinétique alors que la chute n'était pas significative lors de la comparaison J1 et J12 (chute de 0,8 Log(UFC/cm²) (Figure III.16b).

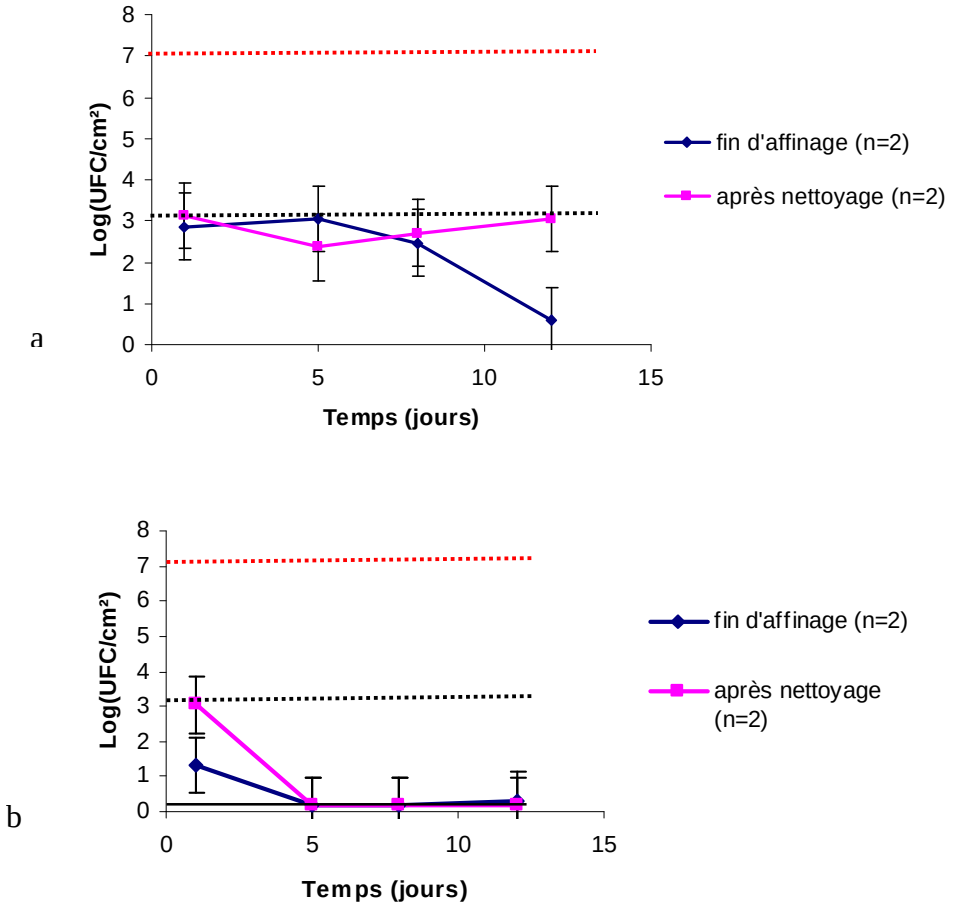


Figure III.17. Suivi de la population des *L. monocytogenes*, souches 481 (a) et 162 (b), inoculées à 10^3 Log(UFC/cm²) sur des échantillons de planches d'affinage aux stades fin d'affinage (avant nettoyage) et après nettoyage. La ligne noire en pointillés correspond au taux d'inoculation. La ligne pleine correspond au seuil de détection (0,18 Log(UFC/cm²)). Le La ligne rouge en pointillés correspond au dénombrement à J12 de *L. monocytogenes* sur une planche autoclavée pour une inoculation de 3 Log(UFC/cm²). Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance ($P < 0,05$).

Ainsi, le stade après nettoyage qui paraissait plus inhibiteur lors des comparaisons entre J1 et J12 (Figure III.16) ne semblait pas pour cette expérience faire chuter la population de la souche 481 mais inhiber leur développement. On observe aussi un effet anti-*Listeria* retardé pour le stade fin d'affinage (avant nettoyage) pour la souche 162. A l'inverse, le stade avant nettoyage apparaissait plus inhibiteur pour la souche 481 lors de la cinétique. Des variations du

comportement des 2 souches de Listeria sur différents biofilms au même stade peuvent donc être notées, entre une simple inhibition de la croissance, jusqu'à une chute de population. Ces variations peuvent être attribuées à une modification du biofilm dans le temps (flores minoritaires, physiologie bactérienne, variation de souches ou d'espèces des flores majoritaires).

Ainsi, la cinétique des populations de *L. monocytogenes* varie en fonction des stades de prélèvement des planches. L'effet inhibiteur des planches peut varier en intensité et en rapidité d'action.

3.4 Effet du taux d'inoculation sur le comportement des 2 souches de *L. monocytogenes* sur les planches d'affinage.

Dans un troisième temps, l'influence du taux d'inoculation des *L. monocytogenes* sur l'effet inhibiteur est déterminée.

3.4-1 Suivi du comportement de *L. monocytogenes* inoculée à 3 et 7 Log(UFC/cm²) sur des planches, après 1 et 12 jours d'incubation

Quatre origines (A, B, C et H) ont été testées avec 2 souches de *Listeria* (162 et 481) à 2 durées d'incubation (J1 et J12), avec 2 répétitions soit un total de 32 résultats par taux d'inoculation (10^3 et 10^7 UFC/cm²). Les 8 planches, prélevées au printemps et à l'automne, étaient au stade fin d'affinage (avant nettoyage). L'effet du taux d'inoculation de *L. monocytogenes* est représenté sur le Figure III.18. Pour la souche 162, des décroissances significatives ($P < 0,05$) de 1,55 et 2,67 Log(UFC/cm²) après 12 jours d'incubation ont été observées avec respectivement des taux d'inoculation de 3 et 7 Log(UFC/cm²). Pour la souche 481, les décroissances de 1,01 et 0,6 Log(UFC/cm²) observées après 12 jours d'incubation pour les taux d'inoculation respectifs de 3 et 7 Log(UFC/cm²) n'étaient pas significatifs ($P > 0,05$).

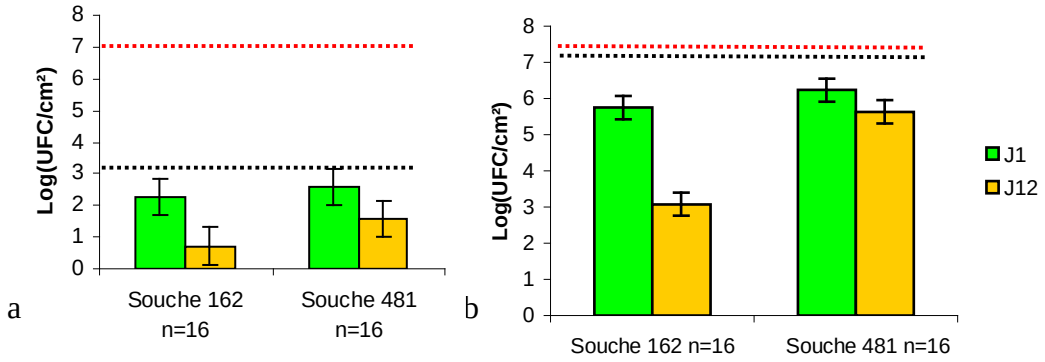


Figure III.18. Comparaison entre les évolutions des 2 souches de *Listeria* sur les planches d'affinage après 1 et 12 jours d'incubation en fonction du taux d'inoculation (Log(UFC/cm²). a. Taux d'inoculation à 3 Log(UFC/cm²)) b. Taux d'inoculation à 7 Log(UFC/cm²)). La ligne noire en pointillés correspond au taux d'inoculation à J0. La ligne rouge en pointillés correspond au dénombrement à J12 de *L. monocytogenes* sur une planche autoclavée pour une inoculation de 3 Log(UFC/cm²). Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance ($P < 0,05$).

Les 2 taux d'inoculation ont révélé une inhibition de *Listeria* pour les 2 souches après 12 jours d'incubation, avec un effet proportionnellement moins important pour la souche 162 et un fort taux d'inoculation (7 Log(UFC/cm²). Ce résultat pourrait correspondre un mécanisme d'inhibition par la production de bactériocines. En effet, l'effet anti-*Listeria* décrit par Carnio *et al*. (2000), sur un fromage à pâte molle, basé sur la production de la micrococcine par *S. equorum* WS 2733 dépend du taux d'inoculation (10^1 et 10^2 UFC/cm²) : plus ce taux était élevé, plus la réduction de *L. monocytogenes* était faible (entre 1 et 3 Log(UFC/cm²)). Cependant, dans l'étude de Giraffa et Carminati (1997), l'effet anti-*Listeria* basé sur une bactériocine synthétisée par *E. faecium* ne dépend pas du taux de contamination, avec une réduction d'1 Log(UFC/cm²) pour les 2 taux, 10^2 et 10^3 UFC/cm². Toutefois, les conditions expérimentales et la présence sur les planches de flores capables de produire des bactériocines (bactéries lactiques, staphylocoques) ne permettent pas d'exclure la présence de ces substances inhibitrices.

L'effet inhibiteur des planches d'affinage est donc influencé par le taux d'inoculation pour la souche 162. Aucune différence n'a pu être mise en évidence pour les 2 taux pour la souche 481.

3.4-2 Cinétique du comportement de *L. monocytogenes* inoculée à 1 Log(UFC/cm²) sur des planches

Pour suivre les populations de *L. monocytogenes* à 1, 5, 8 et 12 jours, 2 souches (162 et 481) ont été inoculées à 10^1 UFC/cm² sur des planches (origine C) à 2 stades de prélèvement. En raison du risque de dispersion des résultats, les planches ont été échantillonnées en triple, soit un total de 48 résultats, pour 4 planches prélevées au printemps. Les résultats sont présentés sur la Figure III.19.

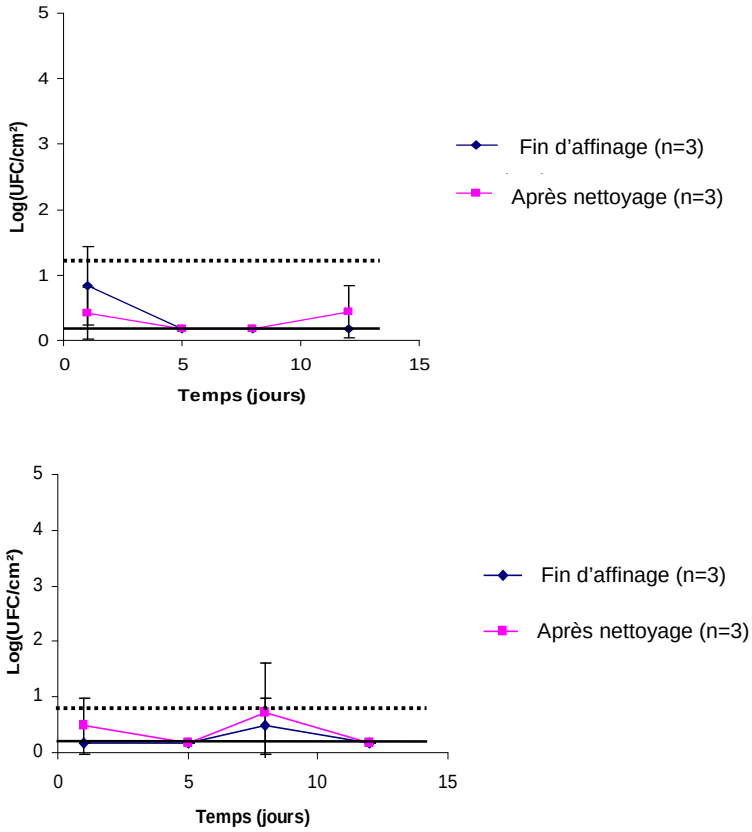


Figure III.19. Suivi de la population des *L. monocytogenes*, souches 481 (a) et 162 (b), inoculées à 10^1 Log(UFC/cm²) sur des échantillons de planches d'affinage aux stades fin d'affinage (avant nettoyage) et après nettoyage. La ligne en pointillés correspond aux taux d'inoculation (1,2 et 0,6 Log(UFC/cm²)). La ligne pleine correspond au seuil de détection (0,18 Log(UFC/cm²)). Les barres d'erreur correspondent aux écart-types.

Pour cette expérience, les 2 taux d'inoculation étaient différents entre les souches : 1,2 et 0,6 Log(UFC/cm²) pour les souches 481 et 162. Pour les 2 souches de *L. monocytogenes*, la tendance était la décroissance des populations, à l'exception des dénombrements réalisés à J12 pour la souche 481 et J8 pour la souche 162 (0,4 et 0,7 Log(UFC/cm²)). Pour tous les dénombrements inférieurs à 0,18 Log(UFC/cm²), la présence de *L. monocytogenes* a été mise en évidence par enrichissement en bouillon Fraser des échantillons de planches selon la norme ISO 11290 (anonyme, 1997b). Cette variabilité des dénombrements de la population de *L. monocytogenes* entre le seuil de détection, 0,18 Log(UFC/cm²) et 0,7 Log(UFC/cm²) est à relier avec un effet de taille de l'inoculum. En effet, Gnanou Besse (2004) a démontré un allongement de la phase de latence, résultant de la variabilité des temps de latences de chacune des cellules en présence, ou effet stochastique. Plus la densité cellulaire est importante, plus la probabilité est élevée d'avoir une cellule dans un état physiologique approprié pour démarrer immédiatement sa croissance. La phase de latence est donc raccourcie lorsque la taille de l'inoculum est élevée. Ce phénomène est amplifié dans des conditions de stress de l'inoculum (Guillier *et al*., 2006), ce qui est le cas lors de l'inoculation sur les planches et l'incubation à 15°C.

Le comportement de *L. monocytogenes* sur les planches d'affinage est directement lié à la présence ou l'absence d'un consortium implanté sur ces planches. En présence d'un consortium actif et vivant, la croissance de *L. monocytogenes* est inhibée avec des différences en fonction des souches de *Listeria* et des stades de prélèvement des planches. L'origine des fromages n'influence pas cet effet anti-*Listeria* observé sur les planches d'affinage. L'influence du taux d'inoculation varie avec la souche de *L. monocytogenes*. L'intensité de l'effet inhibiteur varie dans le temps pour des mêmes conditions (origine, stade), de la simple inhibition de croissance à un effet presque bactéricide. Les suivis des microflores du biofilm des planches d'affinage soulignent la carence nutritionnelle de la surface des planches. Le mécanisme d'inhibition pour les 2 souches de *L. monocytogenes* n'apparaît pas lié au développement d'un groupe microbien particulier. Ainsi, l'hypothèse d'un mécanisme de compétition nutritionnelle semble très probable.

3.5 Comportement de *L. monocytogenes* sur planches d'affinage selon la composition de la suspension d'inoculation

En vue d'étudier l'hypothèse d'une compétition nutritionnelle, des variations dans l'apport nutritif lors de l'inoculation ont été testées : un apport nutritif plus important et nul.

3.5-1 Inoculation avec du TSB 1/20ème enrichi avec une suspension de décrochage provenant de planche autoclavée

Pour tester l'hypothèse d'un mécanisme inhibiteur par compétition nutritionnelle, l'influence de l'apport nutritif sur le comportement des *Listeria* sur planche d'affinage a été évaluée en comparant les comportement des *L. monocytogenes* (souche 162) sur des échantillons de planches du stade fin d'affinage (2 natifs et 2 autoclavés) et son comportement sur un échantillon de planche native, supplémenté en apport nutritionnel, après 1 et 12 jours d'incubation. Sur la base de nos résultats sur la croissance de *Listeria* sur un biofilm autoclavé, l'apport nutritif choisi était les nutriments présents sur une planche d'affinage autoclavé. L'apport nutritionnel a été réalisé avec une suspension de décrochage de biofilm autoclavé, concentrée par centrifugation et re-suspendue dans la suspension d'inoculation de *Listeria* (2 ml TSB 1/20ème avec 10^4 UFC/ml de *L. monocytogenes*). La centrifugation de la suspension de décrochage n'a pas permis de récupérer les éléments solubles de cette suspension. L'enrichissement de TSB 1/20ème a donc été effectué avec les substances organiques d'une planche autoclavée, prélevées par brossage et non solubles. Les dénombrements de *Listeria* inoculées avec le TSB 1/20ème enrichi et des *Listeria* inoculées avec du TSB1/20ème sur des échantillons natifs et autoclavés de planche d'une même origine (C) sont détaillés sur la Figure III.20. Aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence en fonction du support liquide d'inoculation des *Listeria* et les échantillons natifs et autoclavés. Cependant, la population des *L. monocytogenes* inoculées dans du TSB 1/20ème a chuté à J1 et J12 sur des échantillons de planches natives et s'est développée à J1 et J12 sur des échantillons de planches autoclavées comme observé précédemment. Pour des *L. monocytogenes* inoculées avec du TSB 1/20ème enrichi avec les nutriments non solubles présents sur une planche autoclavée, une légère croissance a été mise en évidence à J1 et J12. Ainsi, un apport nutritionnel supplémentaire au TSB 1/20ème entraîne une perte de l'effet

inhibiteur de *Listeria* exercé par la planche d'affinage, tel que décrit dans ce chapitre. Ce résultat est en faveur d'un mécanisme de compétition nutritionnelle. La différence de 2,7 Log(UFC/cm²) observée à J12 entre le dénombrement de *Listeria* inoculée avec du TSB enrichi sur un biofilm natif et le dénombrement de *Listeria* inoculée avec du TSB sur un biofilm autoclavé peut être expliquée de différentes façons. Elle peut être attribuée soit à un autre mécanisme, soit au fait que l'apport nutritif dans cette expérience n'était pas suffisant pour faire disparaître la compétition nutritionnelle entre le consortium microbien et *Listeria*.

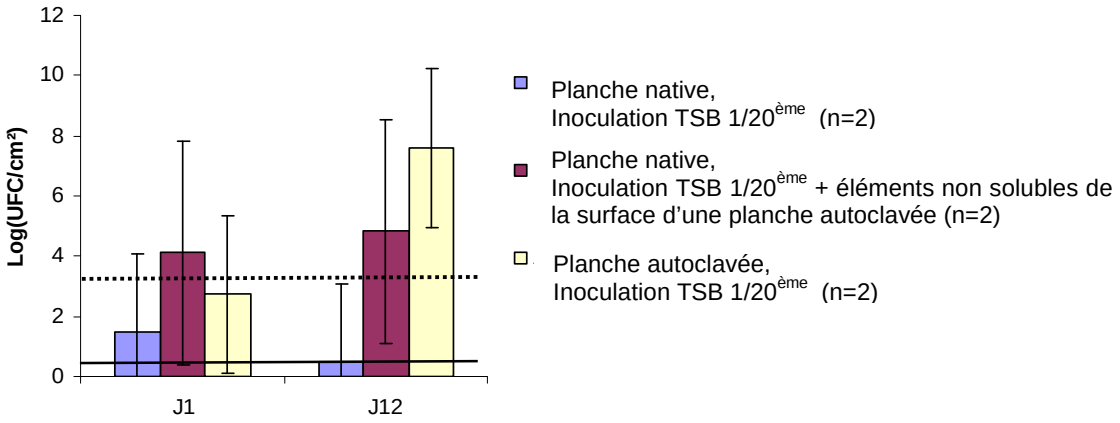


Figure III.20. Comparaison du comportement de la souche *L. monocytogenes* 162 sur des échantillons natifs et autoclavés de planches d'affinage de fin d'affinage (origine C), inoculés avec du TSB 1/20ème et du TSB 1/20ème enrichi en éléments non solubles de la surface de planche autoclavée (60cm² prélevés, centrifugation et reprise dans 2 ml pour une inoculation sur 64cm²). La ligne en pointillés correspond au taux d'inoculation (10^3 UFC/cm²) et la ligne pleine au seuil de détection (0,18 Log(UFC/cm²). Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance ($P < 0,05$).

3.5-2 Inoculation avec de l'eau distillée stérile

Dans l'hypothèse d'un mécanisme inhibiteur basé sur la compétition nutritionnelle, l'influence de l'apport nutritionnel du TSB 1/20ème sur le comportement de *Listeria* (souche 481) sur des échantillons natifs et autoclavés de 2 planches d'affinage aux 2 stades de prélèvement a été évaluée par comparaison des dénombrements suite à une inoculation soit avec du TSB 1/20ème et

soit avec de l'eau distillée stérile, après 1 et 12 jours d'incubation. Les résultats sont détaillés sur la Figure III.21. Pour les échantillons de la planche native, aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence entre les échantillons inoculés avec de TSB 1/20ème et de l'eau distillée ($P < 0,05$). Par contre, pour les échantillons autoclavés, les dénombrements des *Listeria* inoculées avec de l'eau étaient toujours inférieurs aux dénombrements des *Listeria* inoculées avec du TSB 1/20ème. L'apport nutritionnel du TSB 1/20ème n'influence donc pas le mécanisme inhibiteur du biofilm natif contre la souche 481. En revanche, il favorise légèrement la croissance de *Listeria* en l'absence de l'effet barrière du biofilm présent sur les planches d'affinage.

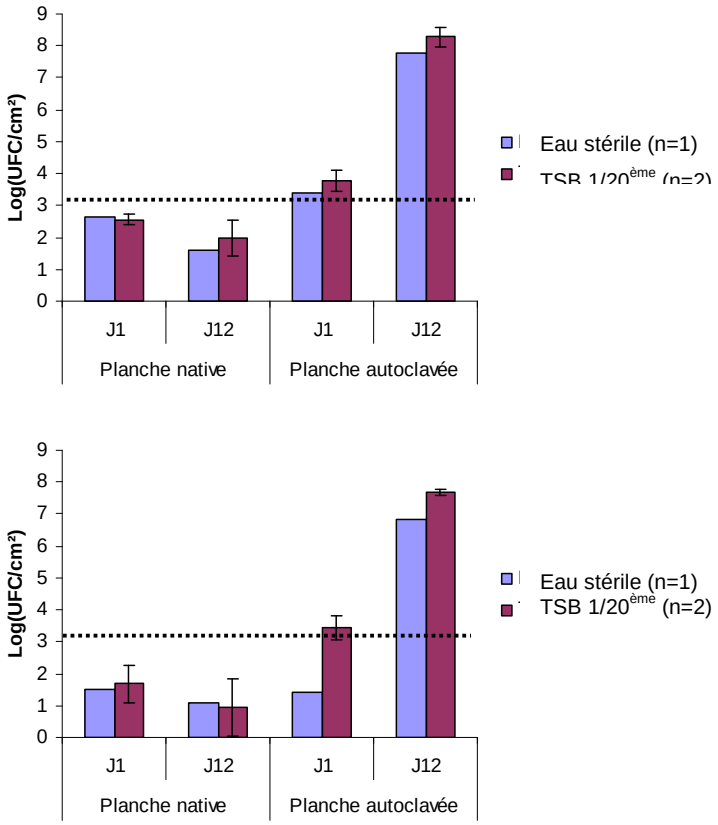


Figure III.21. Comparaison du comportement de la souche *L. monocytogenes* 481 sur des planches d'affinage (origine C) au stade fin d'affinage (a) et après nettoyage (b), inoculée avec du TSB 1/20ème et de l'eau distillée stérile. La ligne en pointillés correspond au taux d'inoculation (10^3 UFC/cm²) et la ligne pleine au seuil de détection (0,18 Log(UFC/cm²). Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance ($P > 0,05$).

3.6 Inoculation de planches neuves

L'influence du support bois sur le comportement des *Listeria* sur les planches d'affinage a été évaluée par suivi des dénombrements sur planche neuve après 1 et 12 jours d'incubation, avec une inoculation de *L. monocytogenes* (souche 481) dans du TSB 1/20ème (3 répétitions) et de l'eau distillée stérile (1 répétition) (Figure III.22). Pour les *Listeria* inoculées avec du TSB 1/20ème, les 3 dénombrements à J12 étaient inférieurs à 0,18 Log(UFC/cm²), et dans 2 cas sur 3, la recherche par enrichissement (Bouillon Fraser, norme ISO 11290, 1997) des échantillons de planche a révélé une absence de *L. monocytogenes*. Pour les *Listeria* inoculées avec de l'eau, le dénombrement à J1 était inférieur à 0,18 Log(UFC/cm²) et la recherche par enrichissement (norme ISO 11290, 1997) des échantillons de planche n'a pas permis de mettre en évidence la présence de *L. monocytogenes* à J12.

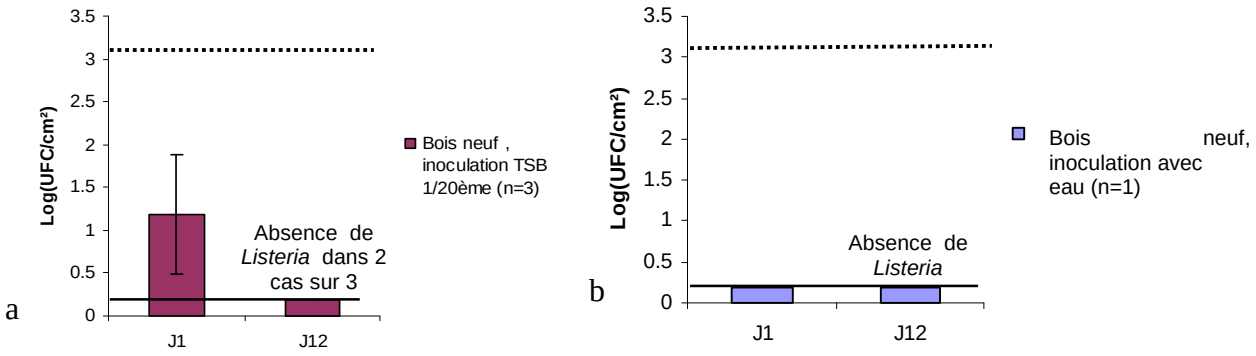


Figure III.22. Comportement de la souche *L. monocytogenes* 481 sur une planche d'affinage neuve inoculée avec du TSB 1/20ème (a) et de l'eau distillée stérile (b). La ligne en pointillés correspond au taux d'inoculation à J0 (10^3 UFC/cm²) et la ligne pleine au seuil de détection (0,18 Log(UFC/cm²)). Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance (P > 0,05). Pour l'inoculation avec du TSB 1/20ème, à J12, 2 cas sur 3 avec absence de *Listeria* par enrichissement en bouillon Fraser selon la norme ISO 11290 (1997). Pour l'inoculation avec de l'eau stérile, à J12, absence de *Listeria* par enrichissement en bouillon Fraser selon la norme ISO 11290.

Dans 2 cas sur 3 pour une inoculation avec du TSB 1/20ème et pour une inoculation avec de l'eau, les planches d'affinage neuves n'ont pas permis la survie de *L. monocytogenes*. Deux hypothèses

peuvent être émises pour expliquer cette disparition : la présence de molécules inhibitrices et l'absence de matière organique nutritives pour *L. monocytogenes*. L'épicéa contient en effet des huiles essentielles qui sont actives envers *Listeria monocytogenes,* avec une réduction de 5 Log(UFC/ml) en phase stationnaire pour une concentration de 0,07% d'huile essentielle (Canillac et Mourey, 2001). L'influence des huiles essentielles de l'épicéa sur le mécanisme anti-*Listeria* décrit sur les planches d'affinage usagées est soumis à 2 contraintes : la présence de ces molécules inhibitrices dans le bois des planches et son activité en présence de matière organique. Or, ce sont surtout les aiguilles d'épicéa qui contiennent les substances actives et non le bois. De plus, les planches subissent au cours de leur usage de nombreux lavages, qui peuvent à terme faire disparaître les molécules actives présentes dans le bois. En effet, dans certains ce sont les extraits aqueux du bois qui démontrent une activité anti-bactérienne (Kim *et al*., 2000). Enfin, alors que l'activité anti-*Listeria* de l'huile essentielle d'épicéa s'accroît en présence de chlorure de sodium et en conditions basiques, la présence de caséinate de sodium et de matières grasses, ainsi que l'utilisation d'un milieu à base de fromage diminue son efficacité (Canillac et Mourey, 2004). Les huiles essentielles ne semblent donc pas être un mécanisme intervenant dans l'effet anti-*Listeria* observé sur les planches d'affinage.

L'absence de matière organique nutritive apparaît donc comme l'explication la plus probable. En effet, par rapport aux planches utilisées pour l'affinage, il n'y a pas de nutriments disponibles pour *Listeria*, sauf le TSB nécessaire à l'inoculation. Or, lorsque les *Listeria* sont inoculées avec l'eau, le dénombrement est inférieur au seuil de détection après les premières 24 h d'incubation. La matière organique est aussi connue pour son effet protecteur sur les bactéries à la surface du bois (Ak *et al.*, 1994). Le pH et l'a_w des échantillons de planches ne semblent pas intervenir comme inhibiteur de croissance. Pour le pH, la valeur de pH 5 mesurée à la surface des planches neuves n'est pas défavorable à la croissance de *L. monocytogenes*. En effet, *L. monocytogenes* peut se multiplier entre des pH de 4,6 et 9,6 (Pearson et Marth, 1990 ; Augustin *et al*., 2005). Pour l'a_w, d'une part, celles de certains échantillons de planche inoculés avec les *Listeria* dans du TSB 1/20ème ont été mesurées juste avant l'inoculation et les comportements des *L. monocytogenes* étudiés. Pour une a_w de 0,950, l'échantillon n'a pas permis la survie de *Listeria* sur 12 jours et avec une a_w de 0,880, l'échantillon de planche n'a pas conduit à une élimination totale de *Listeria* (dénombrement inférieur à 0,18 Log(UFC/cm²) au bout de 12 jours d'incubation). D'autre part, le mode d'inoculation fait évoluer l'a_w vers des valeurs favorables à la croissance de *Listeria*. Ainsi, même si l'a_w ne semble donc pas intervenir dans l'élimination

des *Listeria*, le faible nombre de répétitions et l'absence de suivi de l'a_w appelle à la prudence dans l'interprétation.

Un phénomène de compétition nutritionnelle semble donc intervenir dans l'effet inhibiteur des planches d'affinage envers *L. monocytogenes*. Ce mécanisme ne semble pas être influencé par l'apport nutritionnel du mode d'inoculation (TSB 1/20ème). Le support bois neuf semble aussi être inhibiteur pour *L. monocytogenes*. Dans ce cas, l'inhibition pourrait être liée à une absence de l'effet protecteur et nutritif de la matière organique et/ou des molécules inhibitrices. Le faible nombre d'échantillons pour ces expérimentations (inoculation, bois neuf) appelle néanmoins à la prudence et des répétitions sont nécessaires pour obtenir des conclusions valides.

IV Conclusion

Au préalable, il faut rappeler l'absence de *L. monocytogenes* sur les 23 planches analysées. Les résultats obtenus dans cette partie démontrent que les planches d'affinage inhibent *Listeria monocytogenes* dans des conditions expérimentales proches de celle de l'affinage. Les croissances similaires des 2 souches de *Listeria* sur des planches autoclavées aux 2 stades de prélèvement suggèrent que le principal mécanisme inhibiteur est lié à la présence d'un biofilm vivant sur ces planches. Cet effet inhibiteur apparaît actif contre les 2 souches de *L. monocytogenes* et n'est pas influencé par l'origine des fromages affinés sur les planches ni par le taux d'inoculation. Cet effet a aussi été démontré aux 2 stades de prélèvement des planches avec une meilleure efficacité au stade après nettoyage, stade où le risque d'introduction *L. monocytogenes* dans les caves est le plus important.

La reproductibilité de l'effet inhibiteur observé avec les 23 planches analysées est un point important à relier à l'homogénéité et la stabilité dans le temps des populations microbiennes du biofilm, décrites dans le chapitre précédent. Cette reproductibilité suggère un effet de la biomasse microbienne du biofilm présent sur les planches d'affinage, plutôt que l'action d'une seule souche ou d'un groupe de souches spécifiques. Cependant, les variations entre l'absence de croissance et la réduction de population, jusqu'à 3 Log(UFC/cm²), en fonction du stade de prélèvement, de la souche de *L. monocytogenes* et du jour de prélèvement du biofilm, sont en

faveur de barrières ou de mécanismes cumulables, qui empêchent la croissance de *L. monocytogenes* de façon régulière et répétable, et dans certains cas diminuent la population de ce pathogène. Un effet inhibiteur de *L. monocytogenes* a été démontré pour des planches d'affinage de l'AOC « Munster » par Aérial dans le cadre du programme ACTIA n°03.27. Tout comme pour les planches d'affinage de l'AOC « reblochon », les planches natives du munster inhibent la croissance de *L. monocytogenes* alors que ce pathogène se développe sur les planches autoclavées.

Les hypothèses émises sur le mécanisme d'inhibition des planches d'affinage de l'AOC reblochon dans ces conditions sont pour les deux stades de prélèvement, une absence d'intervention des paramètres physicochimiques (pH et a_w), et une absence d'intervention d'un développement d'une flore spécifique. Pour le stade fin d'affinage, les flores minoritaires ne seraient pas à l'origine de l'effet inhibiteur, et un mécanisme de compétition nutritionnelle par la flore dominante semble jouer un rôle dans cet effet. Pour le stade après nettoyage, la quantité de nutriments présents sur la planche est plus faible pour une population totale microbienne équivalente, ce qui amplifie le mécanisme de compétition nutritionnelle. Cependant, la réduction de la population des *Geotrichum candidum*, cellules grandes consommatrices par leur taille, pourrait diminuer la pression nutritionnelle sur *Listeria*. En complément de l'hypothèse principale de compétition nutritionnelle, la présence de molécules inhibitrices, issues du bois ou synthétisées par certaines flores du biofilm est aussi une piste à ne pas négliger, même si elle apparaît peu probable. Le support bois neuf semble aussi être inhibiteur pour *L. monocytogenes*. Dans ce cas, l'inhibition pourrait être liée à une absence de l'effet protecteur et nutritif de la matière organique et dans une moindre mesure à des molécules inhibitrices.

Article soumis à Journal of Food Protection le 4 janvier 2007

Inhibition of *Listeria monocytogenes* by cheese wooden shelves microflora

Inhibition of *Listeria monocytogenes* by biofilms present on wooden shelves used in cheese ripening.

Mariani C.[123], Oulahal N.[1*], Chamba J.-F.[2], Dubois-Brissonnet F.[3], Notz E.[2], Briandet R.[3]

[1]Université Lyon 1, Université Claude Bernard - Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire, EA 3733, IUT A Département Génie Biologique, Plateforme Alimentec, rue Henri de Boissieu, 01060 Bourg en Bresse, France

[2]Institut Technique Français des Fromages, Route des champs laitiers, BP 30, 74801 La Roche sur Foron, France.

[3]Unité Mixte de Recherche 763-UBHM, Institut National de la Recherche Agronomique et Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires, 25 Avenue de la République, 91744 Massy Cedex, France,

*Corresponding author : Nadia Oulahal, Plateforme Alimentec, LRGIA, Rue Henri de Boissieu F-01060 Bourg en Bresse cedex 09 France, Phone : 33 (0) 4 74 47 21 41, Fax : 33 (0) 4 74 45 52 53, oulahal@iutbourg.univ-lyon1.fr

Short title : Inhibition of *Listeria monocytogenes* by cheese wooden shelves microflora

Key words : biofilm, cheese, *Listeria*, wood.

ABSTRACT

The purpose of the present study was to control the behaviour of *Listeria monocytogenes* on native wooden shelves used for the ripening of the Protected Designation of Origin “Reblochon de Savoie” cheese. The behaviour of 2 strains of *L. monocytogenes* was analysed over time according to the presence of the native multi-species biofilm, the farmhouse origins of cheeses, and the cleaning state of the shelves. A bacteriosatic effect on the two strains of *L. monocytogenes* tested was observed on wooden ripening shelves settled by a living microbial biofilm. After depositing it on shelves, *Listeria* population remained stable or decreased by 2 log(CFU/cm²) after 12-day incubating at 15°C and 98% of relative humidity. In contrast, *Listeria* population grew by 4 log(CFU/cm²) when the microbial activity of the shelves was thermally inactivated. The inhibitory effect was dependent on the strain of *Listeria* tested and the cleaning state of the shelves but was not influenced by the farmhouse origin of cheeses ripened on shelves. This study will point out the matter of using wood in cheese ripening.

Listeria monocytogenes is a Gram-positive facultative anaerobic bacterium, which is the causative agent of listeriosis in humans and animals. Food represents the major source of infection (*18, 47*) and different types of food have been implicated in the outbreaks of listeriosis : meat products (*14, 25*), dairy produce (*24, 27*), seafood products (*17*) or coleslaw (*47*). Among the 13 serotypes of *L. monocytogenes*, almost all human cases of listeriosis have been associated with types 4b, 1/2a, and 1/2b (*20, 49*). On account of its psychrotrophic and ubiquitous nature, the bacteria have been frequently isolated in food processing environments (*16, 38*). Serotype 1/2a was the most frequently isolated from food environment (*29*).
Therefore, the formation of *Listeria* biofilm in food processing environments has become a concern for food manufacturers. The capacity of *L. monocytogenes* cells to adhere rapidly to inert food contact surfaces such as plastics, polypropylenes, rubbers, stainless steel and glass is now well established (*4, 33*). However, the adhesion of *Listeria* depends on the strains (*26, 41*), the physiologic state of the bacteria (*6, 51*) and the nature of the support (*34, 50*).

In addition, microbial biofilms already present on a surface can influence the adhesion and the further development of planktonic cells of *L. monocytogenes* (*7*). Specific physiological interactions affecting the behaviour of *L. monocytogenes* within biofilm have been described by several authors. Blackman and Franck (*5*) reported that *L. monocytogenes* can grow within mixed species biofilms at 10°C and Leriche (*31*) reported that a biofilm of one strain of *Pseudomonas* further the settlement of *L. monocytogenes*. In contrast, many authors have suggested the hindrance of *Listeria* growth on biofilm. Carpentier and Chassaing (*11*) reported that only 4 strains (*Kocuria varians*, *Staphylococcus capitis*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Comamonas testosteroni*) on 29 isolated from food processing plants allowed the growth of

Listeria in binary coculture on stainless steel coupons. Different mechanisms may be involved in the hindrance of *Listeria* settlement and growth on surfaces colonised by bacteria : prevention of adhesion by synthesis of biosurfactants (37), production of bacteriocins (*30, 32*), nutrient competition (*21, 28, 53*).

In contrast, very few studies have been focused on the interactions of wood and microorganisms and on the hygienic status of wood in food plants. In addition, the few existing reports are contradictory, as synthesized Carpentier (*10*). Gehrig et al. (*19*) have indicated that, in dry environments, wood surface was not less hygienic than polyethylene surface. Revol-Junelles et al. (*45*) showed that no growth of bacteria was observed 24 h after depositing 2.4×10^2 *Escherichia coli* cells on a dry poplar wood crate, whereas bacterial development occurred on a glass surface under the same conditions. Some recommendations for a safe use of wood in food processing have been suggested by several authors: dry storage, careful handling, selection of wood species (pine, oak) (*40, 44, 48*). Other studies have reported that inert polymers were consistently more "hygienic" than wood surfaces that allowed bacterial retention after food service washing (*52*). Cross-contamination potentialities have also been demonstrated for wood and polymers chopping boards with a significant increased persistency of bacteria on wood (*23*).

To our knowledge, only two articles have been published on the interactions between *L. monocytogenes* and wooden shelves. Menendez et al (*36*) detected *L. monocytogenes* on several surfaces in a cheese factory. One wooden shelf was positive to *L. monocytogenes* on five wooden shelves analysed. In the same study, iron screw presses, packaging machines, stackers and floors and drainages were also positive to *L. monocytogenes*. Carminati et al. (*9*) studied the cross contaminations of *L. monocytogenes* from inoculated cheeses to other cheeses and sterilised wooden shelves. At the end of the ripening, in the case of an inoculation of *L. monocytogenes* at the beginning of the ripening, two wooden shelves were positive to *L. monocytogenes* on four shelves analysed. In contrast, in the case of an inoculation in the middle of the ripening process, wooden shelves were *Listeria* negative. As the total flora on the surface of the inoculated cheeses were increasing through the ripening process, the authors suggested that the increased population of cheese surface flora could explain the absence of cross contaminations with wooden shelves.

At present, wood can be used as a tool, a packaging or a ripening support in the processes of traditional cheeses under a European dispensation law (rule n° 852/2004 of April 29th) (*2*). Indeed, the wood has a long tradition as a natural material used in cheese ripening and it has been observed for decades by manufacturers that wooden shelves favour the cheese rind development and improve the organoleptic qualities and typical characteristics of cheeses.

Therefore, there is a clear need of systematic investigations on the interactions between *Listeria* cells and wooden shelves during ripening processes in order to assess the hygienic status of this traditional material. In this context, the aim of the present study was to analyse the behaviour of *L. monocytogenes* on native biofilms on wooden shelves used for the ripening process of Protected Designation of Origin (P. D. O.) "Reblochon de Savoie" cheese. The behaviour of 2 strains of this pathogen bacteria was studied according to the presence of the native biofilm, the farmhouse origins of cheeses, the state of cleaning of the shelves, after 1 and 12 days of incubation of wooden shelves at 15°C and 98% of relative humidity. The physicochemical properties of the surface of the wooden shelves (pH and water activity (a_w)) were also recorded.

MATERIALS AND METHODS

Ripening process and factors relevant to the behaviour of *Listeria* on wooden shelves. P.D.O. “Reblochon de Savoie “ is a raw milk smear cheese, produced in the French North Alps. For farmhouses cheeses, the first step of the cheese ripening has taken place in the producer’s ripening room, for 1 week, before the cheeses are bought by a traditional ripener who finishes the ripening procedures on wooden shelves for 2 weeks.

The traditional ripening partner of the present study bought cheeses 7 days after their cheesemaking, from 20 different farmhouses (origins). Cheeses were laid on wooden shelves in 2 distinct ripening rooms. In the first one, cheeses were smeared once and the shelves holding cheeses were daily changed. In the second ripening room, the shelves were in contact with a cheese set over 5 to 9 days (Figure 1). The shelves were cut in lengthwise in spruce wood (*Picea abies*). The shelves analysed had been used in cheese ripening from 6 months to 14 years. They had 13 marks on each side corresponding to the 13 contact zones of the cheeses. After their use in ripening a set of cheeses, the shelves were cleaned with a brushing machine (3 brushes of 3s with cold water) and dried with an air-drying machine. They were then chosen at random for the different steps of ripening, in order to homogenise biofilms present on wooden shelves. The description of the microbial ecology of the biofilm present on those wooden ripening shelves (*35*) showed no influence of the age of shelves on the biofilm ecology but an influence of the farmhouse origins on the minority microflora only (leuconostocs, facultative heterofermentative lactobacilli, enterococci, staphylococci, and pseudomonads). Micrococci, corynebacteria, yeasts, and moulds were found to be the dominant microflora on the shelves and their enumeration count showed a strong homogeneity between the different origins of cheeses. From shelves microbiota, 4 farmhouse origins (A, B, C, and D) which represented the different minority micro-flora profiles on shelves were selected.

The description of the ripening process and the fact that most of the *Listeria* contaminations in the P.D.O. “Reblochon de Savoie” appeared before the transfer of cheeses in the ripening plant (Syndicat Interprofessionnel Reblochon, personal communication) led to identify 2 relevant steps to analyse the shelves : the end of the ripening process, (just before cleaning), and the step after cleaning, before starting a new ripening cycle. The state before cleaning represented the most representative biofilm with the dominant microflora, and the state after cleaning represented the step where the risk of *Listeria* contamination was the most important as new possibly contaminated cheeses are laid down at this state.

Transporting wooden shelves to the laboratory and preparing samples. The protocol of experiments carried out in the present study is summarized in Figure 1. The day before starting the experiments, at the states before and after cleaning, the shelves had been wrapped with 2 layers of clinging films between 2 shelves with the same humidity rate for two hours in a thermal insulated box. After that, they were brought to the laboratory. Shelves were then sawn in wooden samples, 12cm-sided squares around the centre of each mark of cheese (13 cm in diameter) and some of them had been autoclaved at 125 °C for 15 min, packed in aluminium

sheet. One wooden sample per shelf was used to check that the wooden shelves were not naturally contaminated by *L. monocytogenes* before inoculation, by enrichment in Fraser broth (Biokar, Beauvais, France) according to the standard ISO 11290 (*1*). Eight wooden samples sawn per shelf were reserved for the experiment of the effect of the biofilm on the behaviour of *Listeria*. Two times of analysis D1 and D12, which are respectively the first and twelfth day after inoculating shelves and 2 repetitions were systematically chosen for each specific combination of conditions of experimentation : *Listeria* strain, cleaning state and native or autoclaved biofilm. For the physico-chemical characterisation and scanning electron microscopy, eight and four wooden samples were sawn from shelves at the different states before and after cleaning. Each wooden sample was put on support in watertight boxes with water in the bottom in order to saturate boxes with humidity. All the boxes were placed at 15°C so that incubation conditions mimic ripening conditions (15°C and 98% of relative humidity).

Scanning Electron Microscopy (SEM) of Wooden Shelves. Wooden samples had been fixed for 1 h in a glutaraldehyde solution (3% v/v), rinsed 3 times for 10 min in a sodium cacodylate solution (0.2 M, pH = 7.4), dehydrated in a succession of three 10 min alcohol baths of each alcohol concentrations (70, 95 and 100% v/v) and coated with gold in a cathode vacuum evaporator (Jeol JFC 1102, Tokyo, Japan). Observations of samples were made using an Hitachi S-4500 scanning electron microscope (Ibaraki, Japan), at an accelerating voltage of 10kV.

Physicochemical control of wooden shelves. For each shelf, pH and a_w were analysed at days 0, 1 and 12, on wooden samples of shelves before and after cleaning, at 15°C. To analyse the pH, 100 µl of distilled water was put on the mark, then the pH was recorded with a pH surface electrode (Crison, Allela, Spain). For a_w determination, each value was a mean of three measurements performed with a dew point instrument (FA-st/1, GBX Scientific Instruments, Romans sur Isere, France).

***L. monocytogenes* strains, growth conditions and preparation of the microbial suspension.** The strains *Listeria monocytogenes* 162 and 481 were obtained from the Aerial's collection (Illkirch, France). They were isolated from food environment. Long-term stock cultures were stored at –80°C in 20% glycerol solution.
Two days before each experiment, 0.5 ml of frozen cultures of each strain were transferred to 9-ml Trypcase Soy Broth (TSB) (Biomerieux, Marcy l'étoile, France) and were incubated 8 h at 37°C. After a second sub-culture inoculated at 10% v/v in 9ml TSB, 100 ml TSB was inculated at 1% v/v. At the day of experimental inoculation (Day 0), the cultures had been washed twice by NaCl 150mM after centrifugation at 2500g for 10 min. Bacteria were resuspended in 1:20 diluted TSB, and the suspension was adjusted to obtain a cell concentration of $1x10^4$ CFU/ml. The *Listeria* inoculation suspensions were enumerated on Palcam agar (Merck, Lyon, France).

Inoculation, removal and enumerations of *L. monocytogenes* from shelves. In order to inoculate wooden samples, 2 ml of *Listeria* suspensions were deposited on each square in a 64-cm² area, delimited by a rubber joint. The 2 ml were carefully split on the inoculation area by circular movements in order to cover the inoculation area. After that, a weight (200g) had been

applied on the joint through a round support, for 30 min, for the suspension to stay in the delimited area. Wooden samples were then incubated at 15°C in boxes at 99% RH (DS4A-DOMA, Scangaule, Gravigny, France).

Micro-organisms were removed from the shelves for enumeration by using a portable sonicator producing ultrasounds (Branson Ultrasonics, Annemasse, France) with a fundamental resonant frequency of ~ 40 kHz as described previously (*42*). Ultrasound waves had been applied for 10s in an active chamber filled with 15 ml of sterilized ¼ strength Ringer's solution (Biokar, Beauvais, France) directly on 10-cm² shelves of biofilm. The suspension was then homogenized and put in a sterile flask. *Listeria* enumerations were made on Palcam agar (Merck, Lyon, France). The absence of lethality of the 2 strains grown in TSB under the ultrawaves treatment was checked (unshown data). In case of absence of colony, the detection threshold (0.18 log(CFU/cm²)) was used to perform statistical analysis.

A total of 120 wooden samples (from 15 shelves) were inoculated and analysed in this study. Twenty-four samples were used for the study of the behaviour of *Listeria* in the 24 first hours on wooden shelves and 96 samples had been used for studying of the behaviour of *Listeria* on wooden shelves for 12 days of incubation.

Statistical analysis. Results are expressed in log(CFU/cm²). To evaluate the influence of the farmhouse origins of cheeses, the cleaning state, the *Listeria* strains, and the state of biofilm (native/autoclaved) on *L. monocytogenes* population after inoculation on shelves, an analysis of variance has been performed with "Splus 2000"® (Mathsoft, Seattle). The influence of the cleaning state and the state of biofilm on the physico-chemical parameters were also evaluated. The principal effects and interactions were estimated using ANOVA variance analysis and mean comparison (Bonferoni test, with a significant level of $P < 0.05$).

RESULTS

SEM observations of the surface of native wooden shelves at the end of the ripening process and after cleaning. The structural morphology as observed under SEM of native wooden shelves at two stages of the cheese ripening process is presented in Figure 2. At the end of the cheese ripening, bacteria (1 to 2 µm cells) and yeasts (> 5 µm) were clearly visible on wood fibres and in the cracks, isolated or in mucoid aggregates (Figure 2A, 2B, 2C). In accordance with CFU enumerations, identifiable vegetative *Geotrichum candidum* cells could be seen all over the sample (cylinders of around 10 µm). The presence of long filaments of *G. Candidum* along with the wood fibres shows evidence of *in situ* cells multiplication. The microbial biofilm did not cover all the surface of the shelf. The cleaning procedure performed at the end of the ripening procedure strongly reduced the surface microbial population of the shelves as most of the yeast and bacteria were no more visible on the surface (Figure 2D, 2E, 2F). The fibre structure of the wood and the punctuation of tracheids (vascular wood cells) can be observed.

pH and a_w of the surface of the wooden shelves. The influence of the cleaning state and the state of biofilm (native or autoclaved) were evaluated on the physicochemical parameters (pH and a_w) of shelves which had ripened cheeses from the C farmhouse origin. The experiment

consisted in measuring pH and a_w at 2 states of cleaning (before and after) and on 2 states of biofilm (native and autoclaved) before inoculation (D0) and at 2 times of incubation (D1 and D12) with 2 repetitions and a total of 24 results per physico-chemical parameter.

The measurements of the physico-chemical characteristics of the surface of the shelves used for the ripening of cheeses of farmhouse origin (C) are summarized on the Table 1. Shelves pH values were stable around neutral pH, and no statistically difference could be found between pH values recorded at different points of the ripening cycle and after the 12 days of incubation with the pathogens ($P > 0.05$).
In contrast, a_w values from native shelves were significantly lower after the cleaning procedure ($a_w = 0.947$ at the end of the ripening down to 0.886 after the cleaning, $P < 0.05$). A_w values from autoclaved shelves were significantly lower than native shelves (0.901 and 0.910 respectively, $P < 0.05$) the day of inoculation (D0). At days 1 and 12, the differences according to thermal treatment and to the cleaning step were no longer significant, and all the a_w values slightly increased through the shelves incubation.

Evolution of *L. monocytogenes* cells inoculated on wooden ripening shelves at the end of the ripening process. The behaviour of *L. monocytogenes* on wooden shelves during 12 days was assessed by comparing the effect of 2 states of biofilms (native and autoclaved), after the ripening of cheeses from 4 farmhouse origins (A, B, C and D), on 2 strains of *L. monocytogenes* (162 and 481) at 2 times of incubation (D1 and D12). Each case was repeated twice and 64 results were obtained. Shelves used were at the state after cleaning.
No significant difference was found according to the farmhouse origins (unshown data). Whatever the strain of *L. monocytogenes* tested (strains 162 and 481), a strong multiplication of the pathogenic cells were observed on autoclaved wooden shelves. From an initial deposition of 3.1 log(CFU/cm²), *L. monocytogenes* 162 and 481 reached after 12 days a contamination of respectively 7.4 and 7.1 log(CFU/cm²) on autoclaved shelves ($P < 0.05$ when compared to initial inoculation). On the contrary, when depositing in the same conditions on native wooden shelves, *L. monocytogenes* enumerations after 12 days of incubation decreased down respectively to 0.6 and 1.1 log(CFU/cm²) for strains 162 and 481. This low level of enumerable pathogens on the shelves is obtained faster for strain 162 (no statistical difference between day 1 and day 12, $P > 0.05$) than for strain 481 (significant decrease of 1.85 log(CFU/cm²) of *L. monocytogenes* cells between day 1 and day 12).
In order to have a better understanding of the observed differences between the two strains 1 day after deposit, a kinetic of *Listeria* enumeration has been performed during the first hours of incubation of the shelves (Figure 4). The kinetic of the *L. monocytogenes* on wooden shelves in the 24 first hours was assessed by monitoring 2 strains of *L. monocytogenes* (162 and 481) on native and autoclaved shelves at 2 times of incubation (5 and 24h) with 3 repetitions. A total of 24 results were analysed and compared with the enumerations of the *Listeria* suspensions of inoculation. Shelves used had ripened cheeses from the C farmhouse origin and were at the state after cleaning.
On autoclaved shelves, it can be seen in both cases that *Listeria* growth occurred after only a few hours. In accordance with previous observations (Figure 3), strain 162 enumerations were in less than 1 day of incubation at its minimum level, while the decrease was more progressive for the strain 481. For both strains, differences between native and autoclaved shelves became statistically different only after 24h of incubation ($P < 0.05$)

Influence of the different farmhouse origins of cheeses and cleaning state on the anti-*Listeria* effect of the native shelves. The influences of the farmhouse origins of cheeses ripened on shelves (A, B, C and D) and the cleaning state (before and after) on the effect of the native biofilm present on wooden shelves on 2 strains of *L. monocytogenes* (162 and 481) were evaluated. The experiment consisted in testing the farmhouse origins and the states of cleaning at 2 times of incubation (D1 and D12) with 2 repetitions and a total of 64 results.

The evolution of shelves enumerations of *Listeria* over 12 days is represented under two technological factors i) the cheese farmhouse origin i.e. producer A,B,C and D (Figure 5), and, ii) the shelves cleaning process performed between two ripening cycles, respectively for strains 162 and 481 (Figure 6).

Shelves associated with cheeses from the 4 farmhouse origins showed the same efficiency toward *Listeria* multiplication (Figure 5, no significant effect of the cheese origins, $P < 0.05$). The behaviours of the 2 strains of *L. monocytogenes* on shelves harvested at the end of the ripening, and just after the cleaning treatment, are presented in figure 6 for the 4 farmhouses origins. For the *Listeria* strain 162, at day 1, the enumeration of *L. monocytogenes* from wooden shelves after cleaning (0.38 log(CFU/cm²) was significantly lower than the enumeration from wooden shelves before cleaning (2.27 log(CFU/cm², $P < 0.01$). On the contrary, at day 12, no statistical difference could be found on wooden shelves before and after cleaning (0.72 and 0.62 log(CFU/cm², $P < 0.05$). It is also important to note the significant decrease of 1.55 log(CFU/cm²) ($P < 0.01$) between the enumerations at day 1 and day 12 for the biofilm before cleaning. For the strain 481, no statistically difference between enumerations from shelves before and after cleaning could be found at days 1 and 12 ($P < 0.05$). A significant decrease of 1.84 log(CFU/cm²) ($P < 0.01$) could be observed after 12 days of incubation for the biofilm after cleaning.

DISCUSSION

This is the first report of deliberate contamination with *L. monocytogenes* of native wooden shelves harvested in a cheese ripening process. Whatever the conditions tested, we observed no growth and a CFU decrease of the pathogen on the native shelves after 12 days of incubation, while a clear multiplication occurred in the same conditions when the native micro-organisms of the shelves were inactivated by heat. This effect was observed on shelves harvested at different stages of the ripening process and with shelves in contact with cheeses from different farmhouse origins.

The physico-chemical characterisation of the shelves over the different steps of the ripening process and following decontamination treatments indicated that pH and a_w were not the dominant parameters involved in the observed inhibition of *L. monocytogenes*. Shelves pH was stable around neutral values in all tested situations, which do not correspond to limiting values for *L. monocytogenes* that can grow at pH values in the range 4.4 to 9.6 (*43*). A_w values of the surfaces of the shelves differed according to the ripening step and the thermal inactivation treatment, and from Day 1, were above the minimum a_w that allow growth of *L. monocytogenes* (0.90 to 0.93) depending of the strain and its environment (*3*). The only value below that limit was the measurement performed before inoculation on shelves harvested after the cleaning procedure (a_w=0.886). However, the 2 millilitres of the inoculation suspension added for the

artificial contamination of the shelves, and the incubation in water-saturated environment, minimised the influence of the a_w in those conditions. Hence, from day 1 and until day 12, a_w values were all in favour of *Listeria* growth.

Autoclaving shelves, although inactivating the wooden living ecosystem, could also promote the pathogen multiplication by creating or enhancing favourable nutritive conditions (degradation of micro-organisms cells or organic matter by the thermal treatment). However, wooden shelves decontaminated by a non thermal treatment (ionisation) lead to similar multiplication of *L. monocytogenes* (unshown data), suggesting that the nutrients were not limiting factors for the pathogen multiplication on autoclaved shelves.

The stability and reproducibility of this anti-*Listeria* effect in various situations (different steps in the ripening process, different cheese origins) may be linked to the homogeneity and the stability over time of the microbial ecosystem present on shelves as described previously (*35*).

The study also highlighted a difference between the behaviours of 2 strains of *L. monocytogenes* since the first hours after inoculation until the end of incubation. After a five-hour incubation, there was no difference between the inoculation suspension and the removal suspensions for the strain 481 whereas this difference was significant for the strain 162 ($P < 0.05$). This difference at a five-hour incubation might be explained by a difference in removal efficiency, which can be different according to the strain. This phenomenon has been observed by Chae et al. (*12*) that described different swabbing efficiency (93-99% and 90-96%) for 2 strains of *L. monocytogenes* grown on glass sides at 37°C for up to 10 days.

In this study, the step after cleaning appeared to have an anti-*Listeria* effect more important for the strain 481 and faster for the strain 162 than the state before cleaning (Figure 6). Differences in ripening steps were also observed in the study of Carminati et al. (*8*). In fact, they tested the impact of 2 bacterial mixtures used as a surface-smear starter at 3 ripening steps of cheeses on *L. monocytogenes*. They observed differences in the cleaning steps on the *Listeria* effect, mainly explained by differences in pH values and counts of the microbial population. Indeed, *Listeria* growth was favoured by insufficient growth of surface microflora but stopped at low pH values.

The difference in the mechanisms of the anti-*Listeria* effect between before and after cleaning could also be stressed by the difference in the population of *Geotrichum candidum*. In the description of the microbial ecology of the biofilm, *Geotrichum candidum* appeared to be one of the dominant microflora of the biofilm (*35*) and it is known to inhibit *L. monocytogenes*, by competition for nutrients (*22*) or the synthesis of molecules with anti-*Listeria* activity (*15*). The Scanning Electron Microscopy of the shelves revealed that the *Geotrichum candidum* was no longer dominant microflora at the state after cleaning and could be disseminated. It is worth observing that the anti-*Listeria* effect was more important for the step after cleaning, the state where cheeses are laid on in the ripening room. Indeed, as most of *Listeria* contaminations in the P. D. O. “Reblochon de Savoie” cheese could appear before the arrival of cheeses in the ripening plant, the step after cleaning is a critical point because the potential contamination of the shelves can occur at this step when cheeses are placed on the shelves.

Several reports have already mentioned the inhibition of *Listeria* by microbial interactions. Firstly, Meylheuc et al. (*37*) showed that surfaces conditioning by biosurfactants produced by bacteria isolated from foodstuffs, *Pseudomonas fluorescens* (epiphyte flora of salad leaves) and *Lactobacillus helveticus* (used in the manufacture of emmental cheese) reduced adhering by undesirable germs like *Listeria monocytogenes*. Secondly, the synthesis of inhibiting molecules, by *Lactococcus lactis* (nisin) or by a multispecies cheese ripening consortium (pediocin) led to a decrease of *Listeria* population on stainless steel and cheese (*30, 32*). Thirdly, the pH and the acid content, specifically the undissociated forms of acid, can be involved in the mechanism of

inhibition of *Listeria* in cheeses (*39*). To finish with it, competition between bacteria is also an inhibitory mechanism. Jeong and Franck (*28*) have shown the slower growth of *Listeria* at 10°C in presence of competitive microflora (*Flavobactreium* spp and *Pseudomonas* spp). Zhao et al. (*53*) revealed that the applications of competitive-exclusion bacteria (*Lactococcus lactis* and *Enterococcus durans*) can greatly reduce the number of *Listeria* sp. cells (until 3.8 log(CFU/cm²), in floor drains at 3 to 26°C in a poultry processing plant. Gnanou Besse et al. (*21*) showed a "Jameson effect" which has been described by Ross et al. (*46*) and Cornu et al. (*13*), in studying the impact of the inoculation size of *Listeria* on the maximal population attained in cold-smoked salmons. This term designates the simultaneous stop of all the microfloral growth in food, when the dominant bacterial population reaches its stationary phase. This phenomenon is attributed to a competition for nutrients.

In this study, the difference of behaviour of *L. monocytogenes* according to the strain and the cleaning state are in favour of a combination of several different mechanisms of the anti-*Listeria* effect. The fact that the two strains of *Listeria* had the same evolution on autoclaved biofilm suggests that the main mechanism is due to the presence of a native living biofilm present on wooden shelves. Considering our observations, we agree with the results of Carminati et al. (*8*, *9*). They suggested that the presence of abundant and complex microbial flora on cheese surface might help in controlling the *Listeria* contaminations of the cheeses and the cross contaminations with wooden shelves. The repeatability of the anti *Listeria* effect on 19 shelves which have ripened cheeses from 4 different farmhouse origins is in favour of a mass effect of the biofilm. The farmhouse origin of biofilm at the end of the ripening has only an influence on minority microbial flora (staphylococci, leuconostocs, facultatively heterofermentative lactobacilli, enterococci and *Pseudomonas spp*). In contrast, enumerations of dominant microflora, micrococci and corynebacteria (~7 log(CFU/cm²)), and *Geotrichum candidum* (~6 log(CFU/cm²)), and the total count (~7.5 log(CFU/cm²)) were not influenced by the farmhouse origins of cheeses. Therefore, in the present study, the minority microbial flora might not play a key part in the anti-*Listeria* effect at the step before cleaning, whereas the total count and the dominant microflora might play a role in a mechanism of competition for nutrients.

To conclude, this study clearly demonstrates that the living microbial biofilm on wooden ripening shelves have a repeatable anti-*Listeria* effect in experimental ripening conditions. This anti-*Listeria* effect appears to be efficient on two strains of *L. monocytogenes* and not to be influenced by the different farmhouse origins of cheeses ripened on shelves. It has also been demonstrated at different steps in the ripening cycle with an excellent efficiency at the step after cleaning, the step where the shelves are the most exposed to *L. monocytogenes* contamination.

Further researches on the anti-*Listeria* effect on several strains of *L. monocytogenes* will be necessary to explore the complex and probably multi-parameter mechanisms of the inhibition by the living microbial biofilms present on wooden shelves. The objective is to identify the conditions necessary to preserve this effect or, if necessary to establish it, in order to use the biofilms present on wooden shelves as active biological actors of wooden shelves safety in the traditional ripening process.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the French "Association de Coordination Technique pour l'Industrie Agro-alimentaire" (ACTIA). We are very grateful to the SARL Joseph Paccard for providing shelves. We also thank Anne Carnet-Pantiez (LRGIA) for statistical analyses. We are also very grateful to professional partners (Syndicat Interprofessionnel de Reblochon, Arilait Recherches, Comité National des Appellations d'Origine Laitières (CNAOL), Entremont-Alliance, and Aérial) for their financial and intellectual helps.

REFERENCES

1. Anonymous. 1997. Standard ISO 11290 - Methods for the detection and the enumeration of *Listeria monocytogenes*. AFNOR 11, Avenue Francis de Pressenère 93571 Saint Denis La plaine.

2. Anonymous. 2004. Regulation (EC) N° 852/2004 of 29 April 2004 on hygiene of foodstuffs. JO L139/1 of the 30 April 2004.

3. Augustin, J.-C., V. Zuliani, M. Cornu, and L. Guillier. 2005. Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. *J. Appl. Microbiol.* 99:1019-1042.

4. Beresford, M.R., P.W. Andrew, and G. Shama. 2001. *Listeria monocytogenes* adhere to many materials found in food-processing environments. *J. Appl. Microbiol.* 90:1000-1005.

5. Blackman, I.C. and J.F. Franck. 1996. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *J. Food Prot.* 59:827-831.

6. Briandet, R., V. Leriche, B. Carpentier, and M.-N. Bellon-Fontaine. 1999. Effects of the growth procedure on the surface hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* cells and their adhesion to stainless steel. *J. Food Prot.* 62:994-998.

7. Briandet, R., J.-M. Herry, and M.-N. Bellon-Fontaine. 2001. Determination of the van der Waals, electron donor and electron acceptor surface tension components of static Gram-positive microbial biofilms. *Colloids and Surf. B : Biointerf.* 21:299-310.

8. Carminati, D., E. Neviani, G. Ottogalli, and G. Giraffa. 1999. Use of surface-smear bacteria for inhibition of *Listeria monocytogenes* on the rind of smear cheese. *Food Microbiol.* 16:29-36.

9. Carminati, D., A. Perrone, E. Neviani, and G. Mucchetti. 2000. Influence of traditional brine washing of smear Taleggio cheese on the surface spreading of *Listeria innocua*. *J. Food Prot.* 63:1353-1358.

10. Carpentier, B. 1997. Sanitary quality of meat chopping board surfaces : a bibliographical study. *Food Microbiol.* 14:31-37.

11. Carpentier, B. and D. Chassaing. 2004. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident micro-organisms from food industry premises. *Int. J. of Food Microbiol.* 97:111-122.

12. Chae, M.S. and H. Schraft. 2001. Cell viability of *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Microbiol.* 18:103-112.

13. Cornu, M., R. Pouillot, and M.L. Delignette. 2001. Modèle de compétition entre flores pathogène et flore annexe dans un aliment. 7èmes Journées Européennes Lille-Agro-Industrie et Méthodes statistiques. Lille 2002.

14. De Valk, H.M., J. Rocourt, F. Lequerrec, C. Jacquet, V. Vaillant, H. Portal, O. Pierre, P. Pierre, F. Stainer, G. Salvat, and V. Goulet. 2000. Bouffées épidémiques de listériose liées à le consommation de rillettes. France, Octobre-Décembre 1999, Synthèse des données disponibles au 12/01/2000. *Bull. Epidemiol. Hebdomadaire* 4:15-16.

15. Dieuleveux, V., D. Van Der Pyl, J. Chataud, and M. Gueguen. 1998. Purification and characterization of anti-*Listeria* compounds produced by *Geotrichum candidum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:800-803.

16. Donnelly, C.W. 2001. *Listeria monocytogenes* : a continuing challenge. *Nutr. Rev.* 59:183-194.

17. Ericsson, M., A. Elkow, M.L. Danielsson-Tham, S. Loncaveric, L.O. Mentzing, I. Person, M. Unnerstand, and W. Tham. 1997. An outbreak of Listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. *J. Clin. Microbiol.* 35:2904-2907.

18. Farber, J.M. and P.I. Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55:476-511.

19. Gehrig, M., G. Schnell, E. Zürcher, and L.J. Kucera. 2000. Hygienic aspects of wood and polyethylen cutting boards regarding food contaminations. A comparison. *Holz als Roh- und Werkstoff* 58:265-269.

20. Gelin, B.G. and C.V. Broome. 1989. Listeriosis. *J. Am. Med. Ass.* 261:1313-1320.

21. Gnanou Besse, N., N. Audinet, L. Barre, A. Cauquil, M. Cornu, and P. Colin. 2006. Effect of the inoculum size on *Listeria monocytogenes* growth in structured media. *Int. J. of Food Microbiol.* 110:43-51.

22. Goerges, S., U. Aigner, B. Silakowski, and S. Scherer. 2006. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food-borne yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:313-318.

23. Gough, N.L. and C.E.R. Dodd. 1998. The survival and disinfection of *Salmonella* typhimurium on chopping board surfaces of wood and plastic. *Food Control* 9:363-368.

24. Goulet, V., C. Jacquet, V. Vaillant, I. Rebiere, E. Mouret, C. Lorente, E. Maillot, F. Stainer, and J. Rocourt. 1995. Listeriosis from consumption of raw-milk cheeses. *Lancet* 345:1581-1582.

25. Goulet, V., J. Rocourt, I. Rebiere, C. Jacquet, C. Moyse, P. Dehaumont, G. Salvat, and P. Veit. 1998. Listeriosis outbreak associated with the consumption of Rillettes in France in 1993. *J Infect. Dis.* 177:155-160.

26. Harvey, J., K.P. Keenan, and A. Gilmour. 2006. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiol.* In press.

27. Jacquet, C., C. Saint Clement, F. Brouille, B. Catimel, and J.Rocourt. 1998. La listériose humaine en France en 1997-Donnees du Centre National de référence des *Listeria*. *Bull. Epidemiol. Hebdomadaire* 33:142-143.

28. Jeong, D.K. and J.F. Franck. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilm with micro-organisms isolated from meat and dairy processing environment. *J. Food Prot.* 57:576-586.

29. Kathariou, S. 2002. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J. Food Prot.* 65:1811-1829.

30. Leriche, V., D. Chassaing, and B. Carpentier. 1999. Behaviour of *L. monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. *Int. J. of Food Microbiol.* 51:169-182.

31. Leriche, V. 1999. Limitation of *Listeria monocytogenes* settlement on food premises surfaces by creation of biofilms. PhD Thesis. University of Bourgogne.

32. Loessner, M., S. Guenther, S. Stephan, and S. Scherer. 2003. A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1854-1857.

33. Mafu, A.A., D. Roy, J. Goulet, and P. Magny. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *J. Food Prot.* 53:742-746.

34. Mafu, A.A., D. Roy, J. Goulet, and L. Savoie. 1991. Characterization of physicochemical forces involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1969-1973.

35. Mariani, C., R. Briandet, J.-F. Chamba, E. Notz, A. Carnet-Pantiez, R.-N. Eyoug, and N. Oulahal. 2006. Biofilm ecology of wooden shelves used in ripening the french raw milk smear cheese reblochon de Savoie. *J. Dairy Sci.* In press.

36. Menendez, S., M.R. Godinez, J.L. Rodriguez-Otero, and J.A. Centeno. 1997. Removal of *Listeria* spp. in a cheese factory. *J. Food Safety* 17:133-139.

37. Meylheuc, T., C. Methivier, M. Renault, J.-M. Herry, C.-M. Pradier, and M.-N. Bellon-Fontaine. 2006. Adsorption on stainless steel of biosurfactants produced by gram-negative and gram-positive bacteria : consequence on the bioadhesive behaviour of *Listeria monocytogenes*. *Colloids and Surf. B : Biointerf.* 50:146-155.

38. Miettinen, M.K., K.J. Björkroth, and H.J. Korkeala. 1999. Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed field gel electrophoresis. *Int. J. of Food Microbiol.* 46:187-192.

39. Millet, L., M. Saubusse, R. Didienne, L. Tessier, and M.C. Montel. 2005. Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. *Int. J. of Food Microbiol.* 108:105-114.

40. Milling, A., R. Kehr, A. Wulf, and K. Smalla. 2006. Survival of bacteria on wood and plastic particles : dependence on wood species and environmental conditions. *Holzforschung* 59:72-81.

41. Norwood, D.E. and A. Gilmour. 1999. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *J. Appl. Microbiol.* 86:576-582.

42. Oulahal-Lagsir, N., A. Martial-Gros, M. Bonneau, and J.-L. Blum. 2003. "*Escherichia coli*-milk" biofilm removal from stainless steel surface : synergism between ultrasonic waves and enzymes. *Biofouling* 19:159-168.

43. Pearson, L.-J. and E.H. Marth. 1990. *Listeria monocytogenes* -threat to a safe supply : a review. *J. Dairy Sci.* 73:912-928.

44. Prechter, S., M. Betz, G. Cerny, G. Wegener, and E. Windeisen. 2002. Hygiene aspects of wooden resp. plastic cutting boards. *Holz als Roh- und Werkstoff* 60:239-248.

45. Revol-Junelles, A.M., R. Miguindou-Mabiala, D. Roger-Maigne, and J.B. Milliere. 2005. Behaviour of *Escherichia coli* cells and *Bacillus cereus* spores on poplar wood crates by impedance measurements. *J. Food Prot.* 68:80-84.

46. Ross, T., P. Dalgaard, and S. Tienungoon. 2000. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *Int. J. of Food Microbiol.* 62:231-245.

47. Schlech, W.F., P.M. Lavigne, R.A. Bortolussi, A. C.Allen, E.V. Haldane, A.J. Wort, A.W. Hightower, S.E. Johnson, S.H. King, E.S. Nicholls, and C.V. Broome. 1983. Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.* 308:203-206.

48. Schönwälder, A., R. Kehr, A. Wulf, and K. Smalla. 2002. Wooden boards affecting the survival of bacteria? *Holz als Roh- und Werkstoff* 60:249-257.

49. Schuchat, A., B. Swaminathan, and C.V. Brame. 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:169-183.

50. Sinde, E. and J. Carballo. 2000. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylène : the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiol.* 17:439-447.

51. Tresse, O., V. Lebret, T. Benezech, and C. Faille. 2006. Comparative evaluation of adhesion, surface properties, and surface protein composition of *Listeria monocytogenes* strains after cultivation at constant pH of 5 and 7. *J. Appl. Microbiol.* 101:53-62.

52. Welker, C., N. Faiola, S. Davis, I. Maffatore, and C.A. Batt. 1996. Bacterial retention and cleanability of plastic and wood cutting boards with commercial food service maintenance practices. *J. Food Prot.* 60:407-413.

53. Zhao, T., T.C. Podtburg, P. Zhao, B.E. Schmidt, D.A. Baker, B. Cords, and M.P. Doyle. 2006. Control of *Listeria* spp. by competitive-exclusion bacteria in floor drains of a poultry processing plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3314-3320

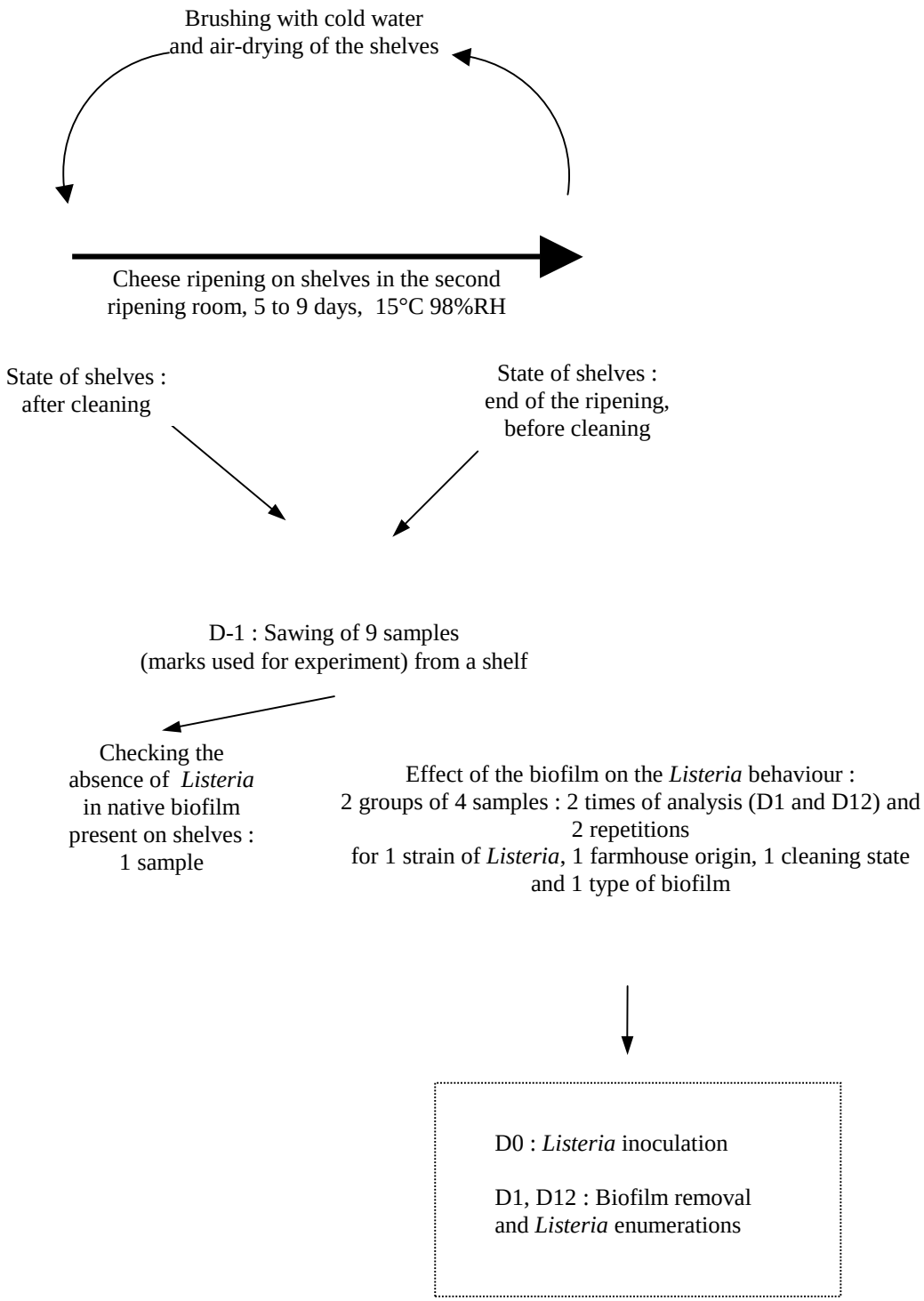


Figure 1. Experimental protocol for the *L. monocytogenes* monitoring on wooden shelves during a 12-day incubation at 15°C and 98% of Relative Humidity (HR). D-1 : day of sawing and when necessary, autoclaving the samples, D0 : the inoculation day of the shelves by *L. monocytogenes*, D1 and D12 : days of removal and enumerations of the *Listeria* cells deposited on the shelves at Day 0. When necessary, samples were autoclaved at Day-1, the day before inoculating.

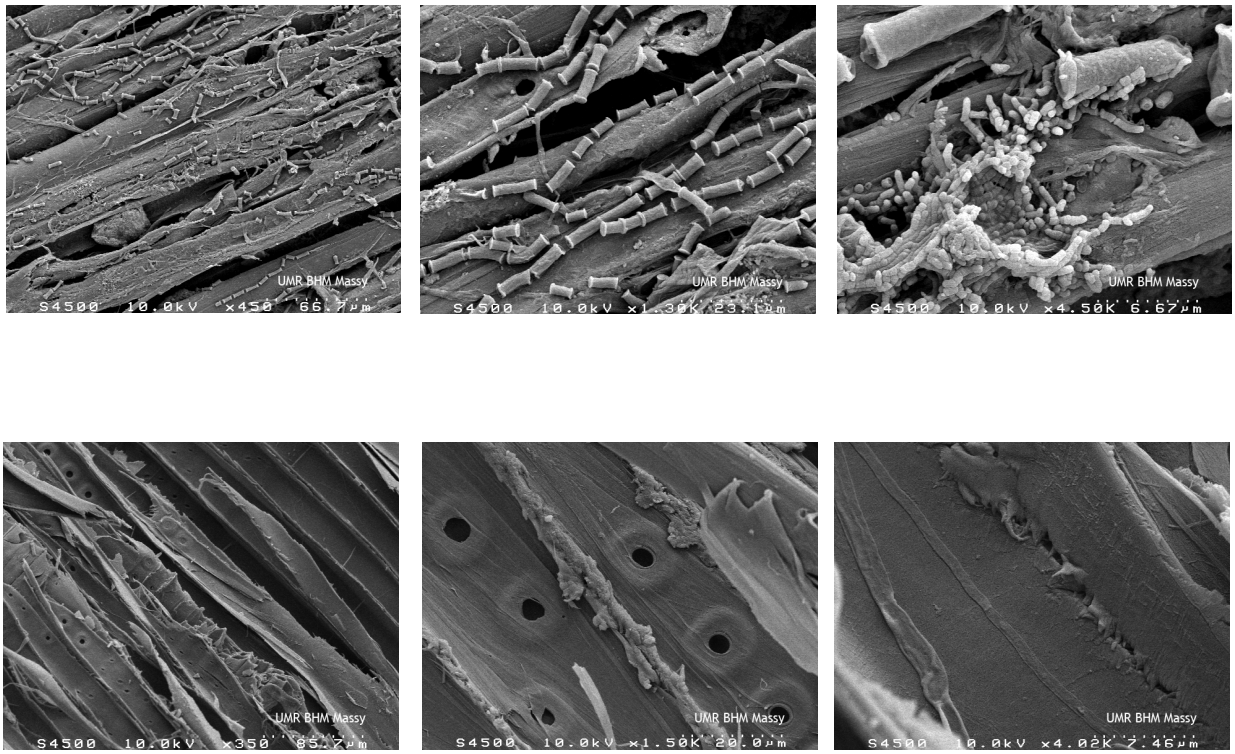
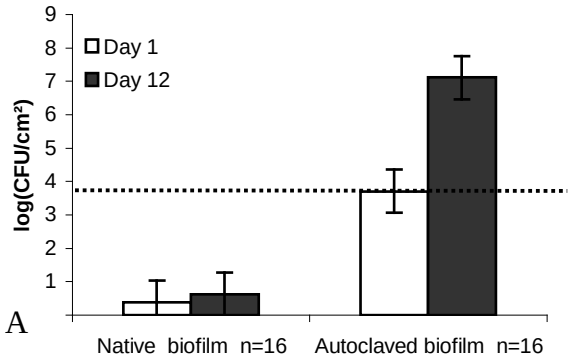


Figure 2. Scanning Electron Microscopy of the surface of ripening shelves : before cleaning (A : x450 ; B : x1300 ; C : x4500) and after cleaning (D : x350 ; E : x1500 ; F : x4000). A and B. Ripening biofilm does not cover the whole surface of the shelf. Some cells are located in the cracks. C. Details of *Geotrichum candidum* (cylinders) and bacteria. D, E and F. Absence of *Geotrichum candidum* and bacteria on the area observed. Structure of the spruce wood fibres, tracheids (D) and punctuations (E).



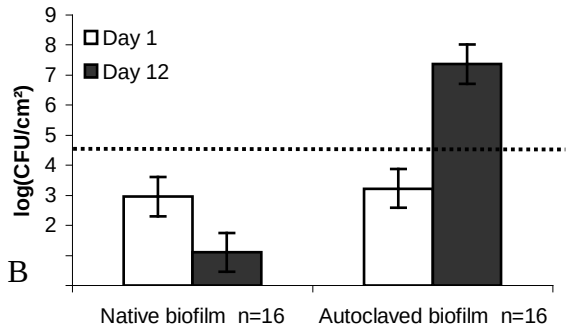


Figure 3. Comparison between the *Listeria* strains 162 (A) and 481 (B) evolutions on native and autoclaved biofilms at the state after cleaning (means for 4 farmhouse origins and 2 repetitions), after 1 and 12 days of incubation (log(CFU/cm²). No statistically significant difference was found according to four farmhouses origins. Error bars indicate confidence intervals ($P < 0.05$). The dotted line corresponds to the enumeration of contaminating suspension deposited on shelves at Day 0.

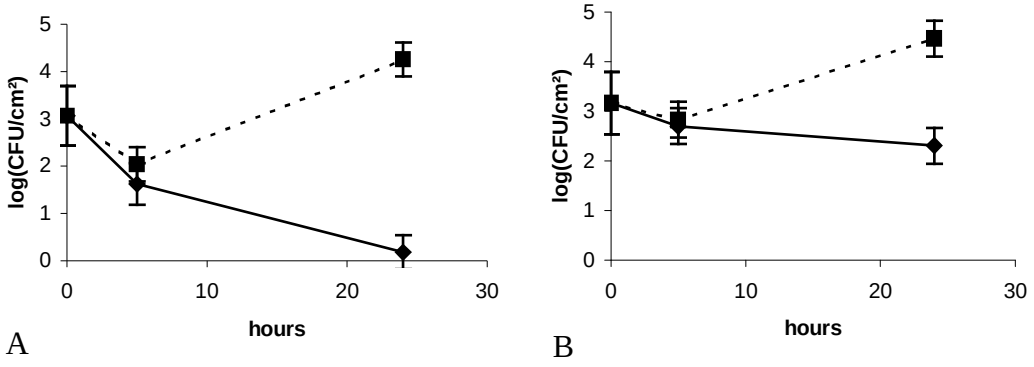


Figure 4. Comparison between the *Listeria* strains 162 (A) and 481 (B) evolutions on native biofilm (♦) and autoclaved biofilm (-■--) in the 24 first hours after inoculation (log(CFU/cm²). No statistically significant difference was found according to four farmhouses origins. Error bars indicate confidence intervals (P < 0.05). 0h : enumeration of the inoculation suspension. 5 and 24h : enumeration of the removal suspensions.

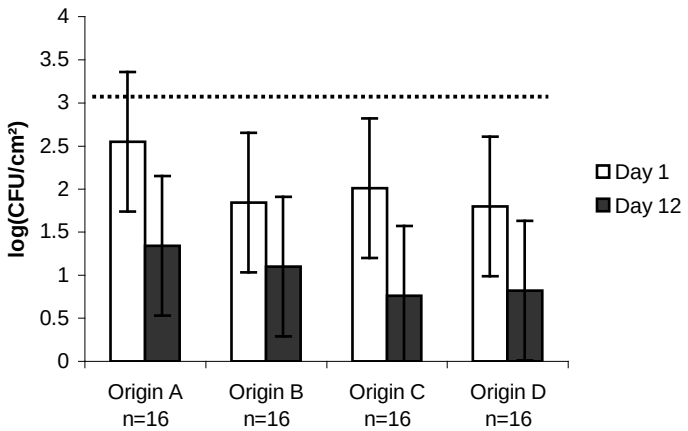


Figure 5. Effect of the farmhouse origin of cheeses on the enumeration (log(CFU/cm²) of the *L. monocytogenes* removed from wooden shelves at days 1 and 12, after inoculation for 2 states of cleaning, 2 strains of *Listeria* and 2 repetitions. The dotted line corresponds to the enumeration of contaminating suspension deposited on shelves at Day 0. Error bars indicate confidence intervals (P < 0.05).

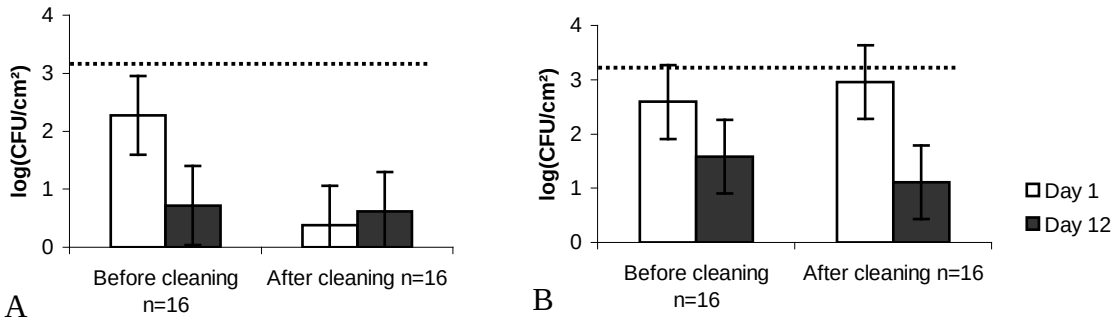


Figure 6. Comparison between the *Listeria* strains 162 (A) and 481 (B) evolutions on biofilms before and after cleaning (means for 4 farmhouse origins and 2 repetitions), after 1 and 12 days of incubation (log(CFU/cm²). The dotted line corresponds to the enumeration of inoculation suspension deposited on shelves at Day 0. Error bars indicate confidence interval ($P < 0.05$).

Table 1. Evolution of pH and a_w values recorded on the surface of wooden shelves according to the type of biofilm (native/autoclaved) and the state of cleaning of the shelves (before/after) at days D0 (before inoculation), D1 and D12.

Mean	Native wooden shelves				Autoclaved wooden shelves			
	a_w		pH		a_w		pH	
Days of following	before cleaning (n=4)	after cleaning (n=4)	before cleaning (n=2)	after cleaning (n=2)	before cleaning (n=4)	after cleaning (n=4)	before cleaning (n=2)	after cleaning (n=2)
D0	0.947	0.886	7.7	7.8	0.910	0.901	7.1	7.5
D1	0.959	0.939	7.3	8.0	0.944	0.940	7.3	6.8
D12	0.970	0.962	7.1	7.6	0.964	0.957	7.2	7.2

Standard errors for a_w and pH values : 0.0072 and 0.31 respectively

Chapitre 4 : Mécanismes d'action de l'effet anti-*Listeria* des planches d'affinage, premières pistes

I. Introduction

Face au danger *Listeria*, de nombreuses études ont cherché à trouver un moyen d'inhiber voire d'éliminer *L. monocytogenes* de l'environnement des industries agro-alimentaires et des aliments, autrement que par les moyens physico-chimiques classiquement utilisés, comme la désinfection chimique par exemple. Ce travail s'est intéressé spécifiquement à un support alimentaire particulier : les planches d'affinage en bois. Un effet inhibiteur de ces planches envers *L. monocytogenes* a été démontré, il est lié à la présence d'un consortium microbien d'affinage vivant à la surface de ces planches. Les différentes études de l'effet inhibiteur des planches d'affinage envers *L. monocytogenes* suggèrent différents mécanismes cumulables, dont le principal serait un phénomène de compétition nutritionnelle. La présence de substances inhibitrices a aussi été présumée. Dans la littérature, ces mécanismes anti-*Listeria* ont déjà été décrits.

La compétition nutritionnelle a été suggérée pour l'inhibition de *L. monocytogenes* par des *Enterobacteriaceae* isolées de feuilles d'endive (*Enterobacter agglomerans* et *Rhanella aquantilis*) sur un milieu de feuille d'endive (Del Campo *et al*., 2001) et par *Carnobacterium piscicola* en Bouillon Brain Heart Infusion (Buchanan et Bagi, 1997). Ce phénomène de compétition nutritionnelle a été modélisé par Cornu *et al*. (2001), sous le nom d'effet « Jameson » (Ross *et al*., 2000). Dans l'étude de Cornu *et al.* (2001), la modélisation est apparue suffisante pour décrire la majorité des interactions observées en milieu liquide et dans des aliments (lait, saumon fumé et jambon cuit). Ce mécanisme de compétition nutritionnelle a aussi été démontré dans du saumon fumé (Effet Jameson, Gnanou Besse *et al*., 2006).

Pour les substances inhibitrices potentielles, elles peuvent provenir de la planche en bois (huiles essentielles) ou être produites par les micro-organismes du consortium présent à la surface des planches (bactériocines, acides organiques…). Les bactériocines sont des protéines à activité antimicrobienne produites par des bactéries pour éliminer ou inhiber la croissance d'autres bactéries (Cleveland *et al*., 2001). De nombreuses bactéries lactiques produisent une grande diversité de bactériocines (lactocoques, lactobacilles, pédiocoques, leuconostocs, entérocoques, *Carnobacterium*) mais aussi des staphylocoques, des corynébactéries, des actinomycètes, des bacilles et des coliformes (Cleveland *et al*., 2001 ; Chen et Hoover, 2003). Pour les acides organiques, 3 molécules ont été étudiées : l'acide lactique, l'acide acétique et l'acide phenylacétique. Les 2 premiers sont issus de la fermentation des bactéries lactiques (Holzapfel *et al*., 1995). L'acide phenylacétique est un composé excrété par *Geotrichum candidum* et certaines bactéries lactiques (Lactobacilles et Leuconostocs) (Dieuleveux *et al*., 1998a ; Valerio *et al*., 2004).

L'objectif de cette partie était donc d'étudier les différentes hypothèses sur les mécanismes d'inhibition émises au chapitre précédent. La première était la présence éventuelle de substances inhibitrices, bactériocines, acides organiques ou autres. Elles ont donc été recherchées dans les suspensions de décrochage filtrées par la mise en évidence d'une activité anti-*Listeria*, avec un spectrophotomètre Bioscreen. Ensuite, le comportement de *Listeria* en mode planctonique en présence du consortium de surface des planches a été suivi. Enfin, un modèle de laboratoire de ré-implantation du consortium de surface des planches sur un support bois a été créé afin de reproduire l'effet inhibiteur observé sur les planches d'affinage. Les paramètres de ce modèle ont été comparés avec les paramètres enregistrés sur les planches (pH et a_w, évolution des flores et comportement de *Listeria*).

II. Matériel et méthodes

1. Prélèvement et cryoconservation des consortia issus des planches d'affinage

Les consortia présents sur les planches d'affinage de fin d'affinage ont été décrochés par brossage. Une surface de 10 cm^2 d'une empreinte de la planche d'affinage était brossée selon la

méthode de brossage décrite au chapitre 2 et détaillée dans l'annexe 2. Le volume final de la solution mère obtenue était de 10 ou 30 ml.

Pour les courbes de croissance de *L. monocytogenes* en modèle planctonique dans des suspensions de décrochage en l'absence du consortium (recherche de molécules inhibitrices), les suspensions de décrochage (1 ml pour 1 cm² de planche) ont été filtrées (0,45µm) puis conservées à -20°C et lyophilisées (Christ, Osterode, Allemagne).

Pour les courbes de croissance de *L. monocytogenes* en modèle planctonique dans des suspensions de décrochage en présence du consortium, les suspensions de décrochage (3 ml pour 1 cm² de planche) ont été utilisées directement sans cryoconservation.

Pour la reconstitution du biofilm en laboratoire, les suspensions de décrochage (3 ml pour 1 cm² de planche) étaient mélangées (volume/volume) avec une solution de lait stérile (110 g/L, Prolait, Eurial Poitouraine, Jaunay Clan, France), sans glycérol pour le consortium A, afin de limiter l'apport nutritionnel. Tous ces échantillons ont ensuite été décongelés pendant 20 min à température ambiante après un stockage à –80°C d'une semaine pour le consortium A et de 7 mois pour le consortium B.

2. Souches de *L. monocytogenes*

Comme précédemment, les 2 souches de *Listeria* utilisées dans cette expérimentation sont les souches 162 et 481, isolées dans l'environnement laitier et stockées à –80°C dans la collection d'Aérial.

Pour les courbes de croissance de *L. monocytogenes* en modèle planctonique en présence du consortium et en modèle biofilm sur support faux fond, ces 2 souches ont été cultivées selon le protocole décrit au chapitre 3 paragraphe II.3. Brièvement, après 3 pré-cultures à 37°C dans du TSB dans les 48 h précédant l'inoculation, les cultures étaient lavées 2 fois par mise en suspension (NaCl 9 g/L, Cooper, Melun, France) et centrifugations successives à 2500g pendant 10min, le jour de l'inoculation. Les bactéries étaient ensuite mise en suspension dans du TSB dilué au 1/20ème et la densité optique à 400 nm ajustée pour obtenir une suspension à 10^8 ufc/ml. La suspension était ensuite diluée pour obtenir une suspension à 10^4 ufc/ml.

Pour les courbes de croissance de *L. monocytogenes* en modèle planctonique sans le consortium, 2 jours avant l'inoculation, un cryotube congelé de chaque souche de *L. monocytogenes*, était mis en culture dans du TSBye (TSB, Biomérieux avec de l'extrait de levure à 6 g/l, AES) à 37°C pendant 20h. Un repiquage à 1% était effectué et les cultures mises à incuber pendant 24 h à 37°C.

3. Courbes de croissance de *L. monocytogenes* en modèle planctonique

3.1 En présence de suspensions de décrochage filtrées et lyophilisées

Le lyophilisat de la suspension de décrochage (5 ml pour 5 cm²) a été repris dans 5 ml de TSBye. Après les deux pré-cultures, les cultures des 2 souches de *L. monocytogenes* étaient diluées au 1/1000 dans 2 milieux, du TSBye ou du TSBye mélangé avec le lyophilisat, jusqu'à obtenir une concentration de 10^5 UFC/ml (N_0). Puis chacune de ces cultures était diluée 4 fois successivement au ½ dans le même milieu (TSBye ou TSBye avec le lyophilisat). Différentes cultures ont été obtenues, avec les inoculums suivants : N_0, $N_{0/2}$, $N_{0/4}$, $N_{0/8}$, $N_{0/16}$.

Le suivi de la croissance bactérienne est réalisé par la mesure de la densité optique (DO) au cours du temps à l'aide du spectrophotomètre automatique *Bioscreen* (*Bioscreen* C, Labsystems, Helsinki, Finlande). 350 µl de différentes cultures ont été placés dans les puits des microplaques, avec 2 puits par inoculum, par souche et par milieu. Le *Bioscreen* est muni d'une commande d'agitation de la microplaque. Il mesure la DO à des intervalles de temps réguliers (10 min) et pendant une durée définie (22 h). Les conditions de croissance dans cet appareil ont été les suivantes : une température de 30°C, une agitation moyenne discontinue de la microplaque, pendant 30 secondes, avant chaque mesure. Deux essais indépendants ont été réalisés.

Le taux de croissance a été déterminé grâce à la technique des dilutions (Méthodologie Symprevius) qui s'appuie sur les temps de détection obtenus avec différentes tailles d'inoculum (Arino *et al*., 1998 ; Augustin, 1999). Les puits de culture sont inoculés « en cascade » par dilution successive de l'inoculum au demi par rapport au précédent, dans le même milieu. Ainsi, dans le deuxième puit, l'inoculum est deux fois plus dilué que le premier, dans le troisième puit deux fois plus dilué que dans le deuxième, … En considérant que pour toutes ces dilutions, les

temps de latence *lag* seront identiques, l'influence du facteur de dilution sur le temps de détection correspond à :

$$\ln\left(\frac{N_d}{N_{01}}\right) = \mu_{\max} \cdot (t_{d1} - lag) \quad \text{et} \quad \ln\left(\frac{N_d}{N_{02}}\right) = \mu_{\max} \cdot (t_{d2} - lag)$$

avec N_d le nombre de microorganismes au seuil de détection, N_{01} et N_{02} les taux d'inoculation respectifs, $\mu_{\max}$ le taux de croissance, t_{d1} le temps de détection pour l'inoculum 1, t_{d2} le temps de détection pour l'inoculum 2 et *lag* le temps de latence.

En effet, on considère deux inoculums dont les taux d'inoculation N_{01} et N_{02} sont différents. Si leur temps de latence est identique, alors les microorganismes qu'ils renferment vont commencer à se multiplier en même temps. On choisit alors un nombre N_d de microorganismes et on regarde à quel temps les deux inoculums vont atteindre ce nombre : ce sont les temps de détection. La Figure IV.1 montre un exemple de détermination d'un temps de détection.

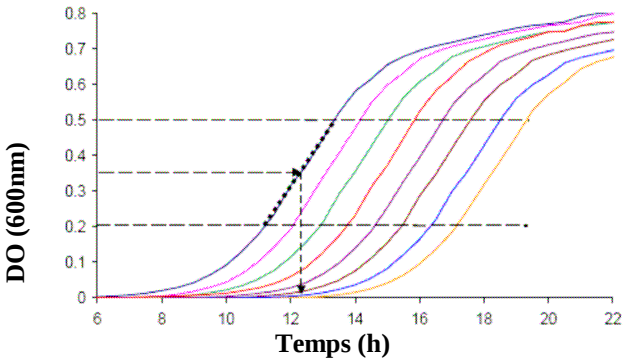


Figure IV.1. Illustration des courbes générées par spectrophotométrie, avec dilutions au demi successives.

La combinaison de ces deux équations donne :

$$\ln\left(\frac{N_d}{N_{02}}\right) - \ln\left(\frac{N_d}{N_{01}}\right) = \mu_{\max} \cdot (t_{d2} - lag) - \mu_{\max} \cdot (t_{d1} - lag)$$

Soit :

$$\ln\left(\frac{N_{01}}{N_{02}}\right) = \mu_{\max} \cdot \left(t_{d2} - t_{d1}\right)$$

Au final :

$$\ln(D) = \mu_{\max} \cdot t_d - b$$

avec D le facteur de dilution entre les deux inoculums considérés. D = {1 ; 2 ; 4 ; 8 ; 16 ; ...}. t_d est la différence entre le temps de détection de ces deux inoculums et b une constante dépendante des conditions expérimentales.

Ainsi, si ln(D) est tracé en fonction du temps de détection, le coefficient directeur de la droite obtenue par régression linéaire correspond au taux de croissance spécifique $\mu_{\max}$, comme le montre la Figure IV.2.

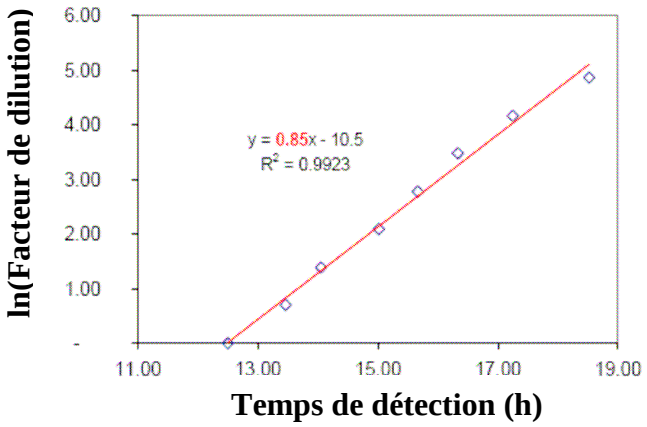


Figure IV.2. Illustration du calcul du taux de croissance, à partir des temps de détection estimés en fonction du logarithme du facteur de dilution D. La régression linéaire effectuée donne une pente de 0,85, ce qui correspond au taux de croissance.

3.2. Dans des suspensions de décrochage

3.2-1 Milieux

Quatre milieux différents ont été utilisés pour tester l'influence du consortium sur l'évolution de *L. monocytogenes* en modèle planctonique :

- des suspensions de décrochage de planches natives, en présence du consortium natif vivant,

- des suspensions de décrochage de planches autoclavées, en présence du consortium inactivé thermiquement,

- des suspensions de décrochage de planches natives, filtrées (0,45µm) pour une élimination physique du consortium

- du TSB 1/20ème, milieu de croissance référence appauvri.

3.2-2 Inoculation et suivi du comportement de *L. monocytogenes* et de l'évolution des principales flores des consortia

A J0, le jour de l'inoculation, les suspensions de décrochage après passage au stomacher et après filtration si nécessaire, ont été directement réparties dans des flacons stériles de 80 ml qui ont été utilisés pour la manipulation (60 ml par flacon correspondant à 20 cm² de consortium prélevé sur planche). Ensuite, l'inoculation par *L. monocytogenes* était réalisée, calculée par rapport au taux d'inoculation des planches d'affinage. Pour celles-ci, 2 ml d'une suspension de *L. monocytogenes* à 10^4 UFC/ml étaient déposés sur 64 cm². Pour 60 ml de suspension de décrochage, 0,6 ml d'une suspension de *L. monocytogenes* à 10^4 UFC/ml étaient nécessaires. Le TSB 1/20ème a été inoculé dans les mêmes conditions.

Les suspensions ont ensuite été incubées à 15°C pendant 12 jours. A intervalles réguliers, les populations de *L. monocytogenes* et des principales flores (FMAR, Levures-moisissures, flore halophile, *Pseudomonas* spp, bactéries lactiques) ont été suivies par prélèvement d'1 ml par flacon. Les dénombrements des *L. monocytogenes* ont été effectués à J1, J4, J7 et J13, et ceux des principales flores à J0, J4, J7 et J13.

3.2-3 Suivi du pH

Deux flacons contenant chacun 60 ml d'une suspension de décrochage des planches natives et autoclavées étaient réservés pour le suivi du pH. A J0, J1 J4, J7 et J13, 2 ml des suspensions étaient prélevés de manière stérile et le pH mesuré à 20°C (pHmètre Tacussel, LPH230T, France).

4. Mise en place d'un modèle de laboratoire pour la reproduction de l'effet anti-*Listeria* sur un support bois

En plus du modèle planctonique, un modèle biofilm sur support bois a été crée pour la reproduction de l'effet inhibiteur en laboratoire. Ce modèle a été conçu pour reproduire le biotope d'une planche d'affinage en terme de conditions physico-chimique et de substances nutritives. Ainsi, la pose du fromage, réserve de nutriment et d'humidité pour la surface de la planche a été remplacée par un milieu gélosé, placée sous un faux fond en bois.

4.1 Matériel

Les faux fonds sont des disques d'épicéa, étuvés à 95°C, placés sur le reblochon après l'affinage sur planche (Figure I.9). Ces faux fonds ont pour fonction de conserver un croutage typique et homogène des fromages malgré l'emballage. Le diamètre est de 13 cm pour une épaisseur d'1 mm.

Deux milieux, liquide et gélosé, sont nécessaires pour ce modèle. Le milieu liquide a pour fonction de favoriser la croissance du consortium et de *Listeria* avec des valeurs d'a_w favorables à leur croissance et un apport de substances nutritives. Ce même milieu additionné d'agar sert de réserve d'humidité et de substances nutritives sous le faux-fond pendant la période d'incubation.

Trois milieux ont été retenus pour être testés : du lactosérum, 2 milieux reconstitués, avec du lactosérum pour l'un et du Prolait pour l'autre dont les composition sont détaillés dans le Tableau IV.1. Le lactate de sodium et l'extrait de levure ont été choisis en fonction de la

composition de la suspension de décrochage d'une planche de fin d'affinage (Tableau II.12). Du lactosérum ou du Prolait ont été ajoutés pour apporter des nutriments d'origine laitière (lactose, galactose, matières grasses par exemple) ainsi que du chlorure de sodium pour favoriser la flore halophile, dominante sur les planches.

Tableau IV.1. Composition des deux milieux reconstitués : avec du Prolait ou avec du lactosérum.

Pour 1 L	Milieu Reconstitué	
	Lactosérum	Prolait
Lactate de sodium (60%) (Sigma)	15g	15g
NaCl (Cooper)	40g	40g
Extrait de levure (Biokar)	10g	10g
Prolait (Eurial Poitouraine)	-	10g
Lactosérum	5g	-

4.2 Choix du milieu liquide d'imprégnation et de dépôt

Le choix du milieu d'imprégnation des faux-fonds et du milieu gélosé placé sous les faux fonds a été réalisé sur 2 critères : l'apport nutritionnel une fois le faux fond imprégné, et l'évolution des principales flores d'un consortia issu d'une planche de fin d'affinage.

4.2-1 Evaluation de l'apport nutritionnel

L'évaluation des apports nutritionnels des 3 milieux a été effectuée sur la base des analyses biochimiques réalisées au Laboratoire d'Analyse Alimentaires et de Recherche Fromagère (LARF). L'apport nutritionnel par cm^2 a été calculé (4 ml pour l'imprégnation et 1 ml pour le dépôt du consortium). Les teneurs en lactates, en lactose et en galactose, en matières grasses et la détermination de l'Azote Total ont été réalisés selon les protocoles décrits au chapitre 2.

4.2-2 Evolution des principales flores du consortium d'affinage dans les milieux liquides testés

Les évolutions des flores principales d'un consortium prélevé sur une planche avec des fromages de l'origine C, cryoconservé dans du lait glycériné à -80°C pendant 6 mois, ont été suivies dans les 3 milieux à tester pendant 96 h à 15°C, ainsi que dans du TSB. L'évolution du pH de ces 4 milieux (3 milieux à tester et TSB) a aussi été suivie. Un cryotube a été ensemencé dans 2 x 20 ml de chacun des milieux, pour les flores et pour le pH, puis les 8 flacons ont été incubés à 15°C. A 48h d'incubation, chaque culture a été repiquée à 10% (v/v).

Pendant l'incubation, l'évolution des flores principales (Flore Mésophile Aérobie Revivifiable, levures et moisissures, flore halophile) a été suivie 1 fois par jour par prélèvement direct d'1 ml dans le flacon. Trois fois par jour (9, 13 et 19h), 2 ml des suspensions étaient prélevés de manière stérile et le pH mesuré à 20°C (pHmètre Tacussel, LPH230T, France).

4.3 Préparation des faux-fonds, dépôt des consortia et inoculation par *L. monocytogenes*

4.3-1 Préparation des faux-fonds

Suite au calcul de l'apport nutritionnel et au suivi des flores dans les 4 milieux liquides, un seul milieu liquide a été choisi. Après autoclavage à 121°C pendant 15 min des faux fonds, ils ont été imprégnés avec le milieu liquide choisi. Ils ont été placés dans 60 ml du milieu choisi dans une grande boite de Pétri (140 mm de diamètre) de manière stérile. Après 10 min, temps de contact nécessaire pour une imprégnation maximum, le faux-fond a été égoutté à l'aide d'une pince stérile puis placé sur une gélose du même milieu dans une grande boite de Pétri (140 mm).

4.3-2 Dépôt des consortia et inoculation par *L. monocytogenes*.

Une fois le faux-fond imprégné et placé sur la gélose nutritive, les cryotubes contenant les consortia (1 ml) étaient décongelés à température ambiante pendant 20 min. Chaque cryotube est ensuite additionné d'1 ml du milieu d'imprégnation puis déposé sur le faux fond sur une surface délimitée par un joint en caoutchouc (64 cm^2) (Figure IV.3). Les 2 ml étaient ensuite soigneusement répartis sur toute la surface de contamination avec des mouvements circulaires.

Un poids était ensuite appliqué sur le joint par l'intermédiaire d'un support rond (boite de Pétri) pendant 30 min. Les grandes boites de Pétri étaient ensuite mises à incuber à 15°C. Deux jours après, 2 ml de la suspension d'inoculation de *L. monocytogenes* étaient déposés sur la même surface par le même procédé. Les grandes boites de Pétri étaient ensuite remises à incuber à 15°C.

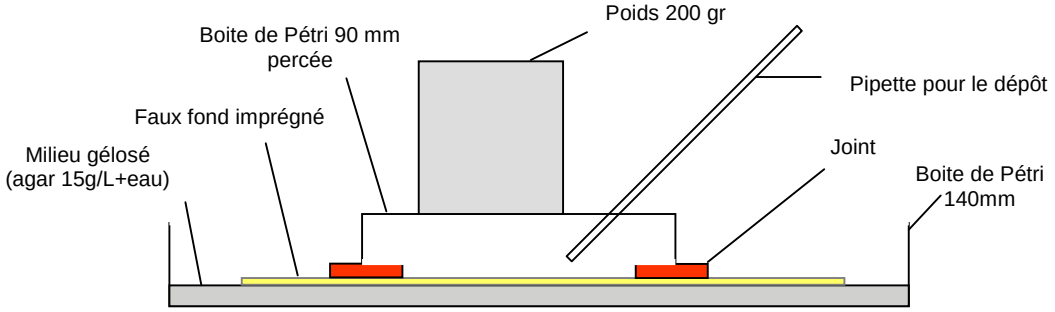


Figure IV.3. Schéma du dispositif expérimental du dépôt des consortia et de la contamination par *L. monocytogenes* sur les faux fonds.

4.4 Prélèvements des consortia des faux-fonds

Pour le décrochage des consortia, à l'aide d'une pince stérile, le faux-fond était placé dans un grand sac stomacher contenant 80 ml d'une solution de Ringer au ¼ (Biokar, Beauvais, France). L'ensemble était ensuite passé au stomacher pendant 5 min à grande vitesse. La suspension de décrochage était ensuite placée dans un flacon stérile. Elle constituait la solution mère (10^0) sur laquelle les dénombrements microbiologiques étaient effectués.

4.5 Suivi des paramètres physico-chimiques

Le pH et l'a_w de surface des planches ont été mesurés selon les mêmes protocoles que ceux décrits au chapitre 2 : avec une électrode de surface (Crison, Allela, Espagne) pour le pH et un appareil à point de rosée (FA-st/1, GBX Scientific Instruments, Romans sur Isere, France) pour l'a_w.

5. Dénombrements des consortia et de *L .monocytogenes*

Les dénombrements de certaines flores des consortia ont ensuite été effectués en double, en surface, à l'aide d'un ensemenceur spiral (Interscience, Saint Nom La Bretèche, France), pour les échantillons sans *Listeria* ou par dilution manuelle dans du Ringer et étalement au râteau, pour les autres. Les différents milieux ainsi que les conditions d'incubation sont résumés dans le Tableau IV.2. Les fournisseurs des différents produits sont détaillés dans le chapitre 2, sauf pour le Palcam au chapitre 3. La composition ainsi que la sélection des milieux de dilution et de dénombrement sont détaillées en annexe 3.

Tableau IV.2. Méthodes de dénombrement des flores des suspensions de décrochage.

Flores recherchées	Milieu sélectif	Conditions d'incubation		
		Durée (jrs)	Temp. (°C)	Ae[a]/MAe[b]
Flore Mésophile Aérobie Revivifiable	PCA	7	20	Ae
Flore halophile	Chapman	2	37	Ae
Levures et Moisissures	CGA	5	20	Ae
Bactéries lactiques	MRS + A[c]	3	30	MAe
Pseudomonas spp	GSP + P[d]+ A[c]	3	20	Ae
Listeria spp	Palcam	2	37	Ae

[a]Ae : aérobie.
[b]MAe : microaérobie.
[c]A: Amphotéricine B (80 mg/L)
[d]P : Penicilline G (57,8 mg/L).

6. Analyses statistiques

Les dénombrements sont exprimés en Log(UFC/cm²) ou Log(UFC/ml). Pour évaluer l'influence des différents facteurs, des analyses de variance ont été réalisées avec le logiciel "Splus 2000" (Mathsoft, Seattle, USA). Les facteurs de chaque analyse sont détaillés dans la partie résultats, lors de la présentation de l'analyse. Les principaux effets et les interactions ont été estimés avec une analyse de variance ANOVA (de type III en cas de groupes déséquilibrés), et des comparaisons de moyenne (test de Bonferoni, avec un niveau significatif de $P < 0.05$). Lorsqu'un seul facteur était étudié, les écart-types ont été utilisés pour différencier les groupes.

III. Résultats – Discussion

1. Suivi du comportement de *L. monocytogenes* en présence de lyophilisat de suspensions microbiennes prélevées sur planches d'affinage filtrées

La présence de molécules inhibitrices à la surface des planches d'affinage a été recherchée par comparaison des croissances de *L. monocytogenes* dans du TSBye et du TSBye additionné du lyophilisat d'une suspension de décrochage de planche d'affinage filtrée (0,45µm). Cette expérimentation a été réalisée par L. Guillier à Massy. Les molécules inhibitrices potentiellement présentes dans le lyophilisat de la suspension de décrochage vont ralentir ou inhiber la croissance de *Listeria* dans le TSBye.

La présence de substances inhibitrices a été recherchée dans une suspension de décrochage, prélevée par brossage sur 1 planche d'âge moyen au stade fin d'affinage (origine C), puis lyophilisée et reprise dans du TSBye (1 ml pour 1 cm² de surface de planche). Deux souches de *L. monocytogenes* (162 et 481) ont été utilisées, dans 2 milieux (TSBye et TSBye + lyophilisat) avec 5 tailles d'inoculum différentes (N_0, $N_{0/2}$, $N_{0/4}$, $N_{0/8}$ et $N_{0/16}$) et 2 puits par dilution et par souche. Deux essais indépendants ont été réalisés. Vingt courbes de suivis de DO ont ainsi été obtenues pour chaque souche et par milieu. Un des essais pour la souche 162 est représenté sur le Figure IV.4. La comparaison des courbes de DO dans du TSBye et du TSBye + lyophilisat indique un retard de croissance de la souche 162 dans le TSBye + lyophilisat. En effet, la culture dans le milieu avec lyophilisat a atteint une DO de 0,5 à 2 h. Cette même DO est obtenue à plus de 4 h dans le milieu sans lyophilisat en fonction de la dilution. Pour cet essai, les deux taux de croissance (pente des droites) observés pour cette souche dans les deux milieux sont nettement différents (Figure IV.4 (C)). Les résultats étaient similaires pour la souche 481 et le Tableau IV.3 résume les taux de croissance pour les 2 souches (162 et 481), les 2 milieux (avec et sans lyophilisat) et les 2 essais. Il faut souligner le bonne répétabilité entre les 2 essais. Dans tous les cas, le taux de croissance des 2 souches de *L. monocytogenes* était environ divisé par 2 avec l'ajout du lyophilisat dans le milieu, ce qui signifie un retard de croissance lié à la présence de molécules bactériostatiques dans la suspension de décrochage lyophilisée d'une planche au stade fin d'affinage.

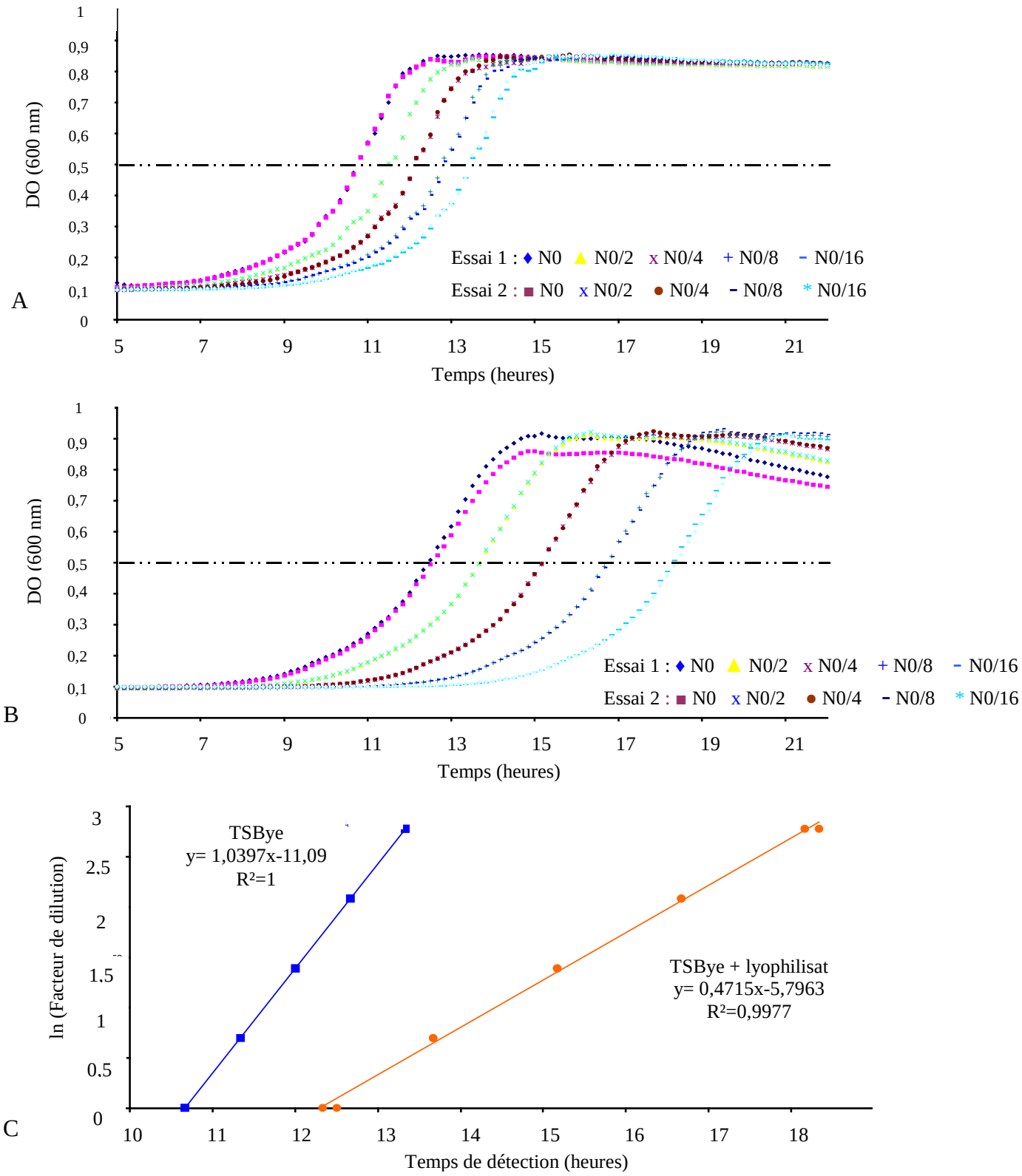


Figure IV.4. Cinétiques d'évolution des densités optiques (DO) à 600nm à 30°C pour la souche 162 (A) en milieu TSBye (B) et en milieu TSBye + lyophilisat. Chaque point est une moyenne des DO de 2 puits. (C) Détermination du taux de croissance (=pente des droites de régression de la souche 162 en milieu TSBye (bleu) et en milieu TSBye + lyophilisat (orange) pour l'essai 1(L. Guillier, Massy).

Tableau IV.3. Taux de croissance observés pour les deux souches de *L. monocytogenes* 162 et 481 en milieu TSBye avec ou sans lyophilisat (L. Guillier, Massy).

Souche	Essai	Taux de croissance (h^{-1})	
		TSBye	TSBye + lyophilisat
162	1	1,04	0,47
	2	1,01	0,55
481	1	0,96	0,44
	2	1,00	0,58

La présence de molécules bactériostatiques a donc été mise en évidence dans une suspension de décrochage lyophilisée d'une planche au stade fin d'affinage. Ces molécules bactériostatiques peuvent provenir de l'activité métabolique des bactéries présentes à la surface de la planche ou de la planche elle-même.

Houstma *et al*. (1994) ont étudié la croissance de *L. innocua* dans un milieu liquide proche du TSBye, en fonction de concentrations connues de lactate. Ils ont évalué cette croissance dans un milieu contenant des extraits de levure et peptone, à 30°C, en fonction de différents pH. Pour un μ_{max} de 0,55 h^{-1} en l'absence de lactate, le taux de croissance à pH 7 (équivalent au pH de surface des planches) est divisé par 2 pour une concentration de lactate de 1100 mmol/L et l'inhibition est totale pour une concentration de 1340 mmol/L. Ainsi, pour cette étude, une division par 2 du taux de croissance correspond à une concentration importante de molécules inhibitrices, relativement proche de la concentration nécessaire pour une inhibition totale.

Afin d'évaluer l'impact réel de ces molécules inhibitrices sur l'effet inhibiteur observé sur les planches de notre étude, il faut dans un premier temps ne pas oublier que la lyophilisation et la méthode de prélèvement (brossage) ont pu influencer sur la concentration et les molécules inhibitrices. Ensuite, il faut estimer la quantité d'eau présente en surface de la planche. La seule valeur de quantité d'eau que nous connaissons et qui s'approche de la quantité d'eau en surface est la quantité d'eau contenue dans le premier millimètre de la planche. En effet, connaissant le taux d'humidité d'une planche au stade fin d'affinage (47 % m/m) et la masse volumique de l'épicéa anhydre (0,35 $g.cm^{-3}$), la quantité d'eau contenue dans le premier millimètre d'une

planche peut être calculée à la condition de négliger le gradient d'humidité en profondeur de la planche. Ainsi, le premier millimètre d'1 cm² de planche au stade fin d'affinage contiendrait 0,02 ml d'eau. Or, les molécules inhibitrices d'1 cm² de planches lyophilisées ont été reprises dans 1 ml de TSBye. Ces mêmes molécules étaient donc bien plus concentrées dans la phase aqueuse du biofilm de surface des planches. D'après les travaux d'Houstma *et al*. (1994), une division par 2 du taux de croissance correspond à une concentration proche de la concentration nécessaire pour une inhibition totale. Par contre, la libre circulation des molécules en biofilm n'est pas possible, à la différence du mode planctonique, ce qui limiterait l'action de ces molécules en biofilm sur les planches. Ainsi, l'importance de la présence de molécules inhibitrices dans le mécanisme de l'effet inhibiteur observé sur les planches d'affinage est difficilement estimable. L'absence de différences entre les souches pour la réduction du taux de croissance en modèle planctonique suggère néanmoins un mécanisme supplémentaire ou différent pour l'effet inhibiteur observé sur les planches. En effet, celui-ci était différent entre les 2 souches de *L. monocytogenes*. De plus, il faut aussi garder à l'esprit que la suspension de décrochage testée ne provenait que d'une seule planche au stade d'affinage et que des répétitions de cette expérience s'imposent sur plusieurs planches avec des âges différents et pour des origines de fromages différentes, afin de s'assurer du caractère général de cet effet.

Ainsi, la présence de molécules bactériostatiques a donc été mise en évidence dans une suspension de décrochage lyophilisée d'une planche au stade fin d'affinage. L'influence exacte de ces molécules dans l'effet inhibiteur observé sur les planches reste à déterminer.

2. Comportement de *L. monocytogenes* dans des suspensions de décrochage de planches d'affinage

Suite à la mise en évidence de molécules bactériostatiques dans le lyophilisat d'une suspension de décrochage, le comportement de *L. monocytogenes* en présence d'un consortium inhibiteur sous forme planctonique a été étudié. Les évolutions du pH et des principales flores du consortium ont aussi été étudiées.

2.1 Suivi de la population de *L. monocytogenes* dans les suspensions de décrochage

Deux planches de fin d'affinage pour un même lot de fromages de l'origine C ont été utilisées pour obtenir les suspensions de décrochage (1 cm² de planche pour 3 ml de suspension) inoculées avec 2 souches de *L. monocytogenes* (162 et 481). Une de ces deux planches a été autoclavée (125°C, 15 min). 12 courbes de croissance de *L. monocytogenes* ont été obtenues. Chaque souche de *L. monocytogenes* était ensemencée dans 6 flacons :

- trois flacons avec des suspensions de décrochage de la planche native (présence du consortium natif vivant),

- un flacon avec des suspensions de décrochage de la planche autoclavée (consortium inactivé thermiquement),

- un flacon avec des suspensions de décrochage de la planche native, après une filtration stérilisante à 0,45µm,

- un flacon avec du TSB 1/20ème (milieu de culture de référence appauvri).

Les évolutions des populations des 2 souches de *L. monocytogenes* dans des suspensions de décrochage de planches natives et autoclavées et du TSB 1/20ème sont représentées sur la Figure IV.5. Dans le TBS1/20ème et les suspensions des planches natives et autoclavées, les 2 souches ont une évolution parallèle, sauf pour la suspension de décrochage de planche native à J13, où une différence de 0,8 Log(UFC/ml) est observée entre les 2 souches (4,3 et 3,5 Log(UFC/ml) pour les souches 481 et 162, $P < 0,05$). Dans la suspension de décrochage de la planche native, les 2 souches de *L. monocytogenes* se sont développées de 2,5 à 4 Log(UFC/ml) pendant les premières 24 h puis sont restées stables aux alentours de 4 Log(UFC/ml). Par contre, dans les suspensions issues de la planche autoclavée, les 2 souches se sont développées pendant les 13 jours jusqu'à 6,5 et 7 Log(UFC/ml) pour les souches 481 et 162, respectivement. A J13, les différences de dénombrement entre les suspensions de décrochage des planches native et autoclavée sont de 2,2 et 3,5 Log(UFC/ml) pour les souches 481 et 162 ($P < 0,05$). Dans le TSB 1/20ème, les 2 souches de L. monocytogenes se développent de 2,5 à 8 Log(UFC/ml). Une différence de comportement de *L. monocytogenes* dans des suspensions de décrochage de planches natives et autoclavées a donc été mise en évidence avec une inhibition de croissance de

ce pathogène par la suspension de décrochage de la planche native. L'autoclavage a donc éliminé le facteur inhibiteur de *Listeria*, qui pouvait être le consortium présent ou des composés modifiables par les hautes températures et/ou la pression (125°C, 15 min). En comparant les comportements de *L. monocytogenes* en mode planctonique et sur planches, la différence de comportement entre planches natives et autoclavées et consortia natif et autoclavé est similaire. Par contre, la différence de comportement entre les souches de *L. monocytogenes* 162 et 481 observée sur planche ne s'observe pas en mode planctonique. De même, les réductions de population de *L. monocytogenes* observées dans certains cas sur planches n'ont pas été mises en évidence en modèle planctonique avec ce consortium.

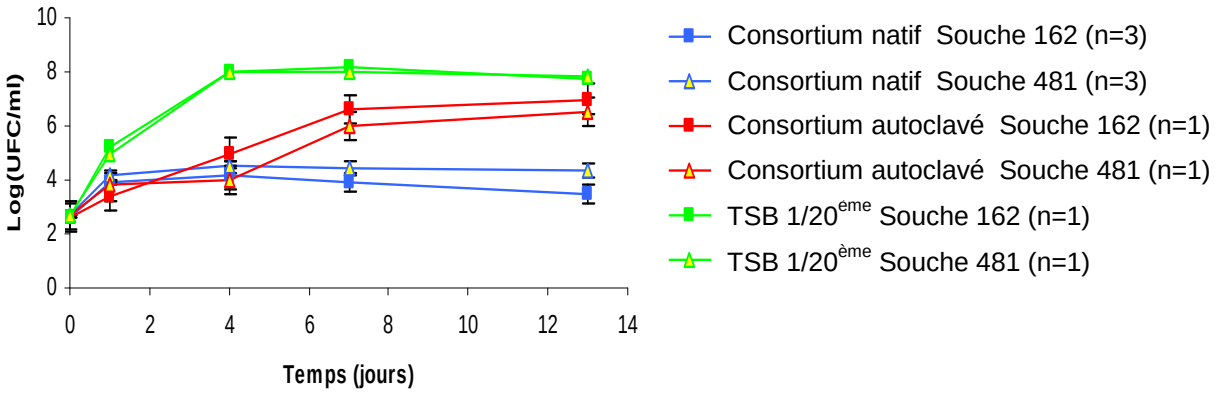


Figure IV.5. Evolution des populations de *L. monocytogenes* (Souches 162 et 481) à 15°C dans des suspensions de décrochage de planches natives (consortium natif) et autoclavées (consortium autoclavé) et du TSB 1/20ème. Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance de l'analyse de variance réalisée sur les résultats des consortiums natifs et autoclavés.

La Figure IV.6 compare les évolutions des populations de *L. monocytogenes* à 15°C dans des suspensions de décrochage filtrées (0,45µm) de planches natives (élimination physique du consortium) et des suspensions de décrochage de planches autoclavées (inactivation thermique

du consortium). Chaque courbe représente la moyenne des populations des 2 souches de *Listeria* 162 et 481. Un développement similaire des *Listeria* dans ces 2 milieux est observé avec une croissance de 2,5 à 6,8 Log(UFC/ml) en 5 jours puis une stabilisation des 2 populations. La superposition des courbes des populations des *Listeria* dans ces 2 milieux indique que l'autoclavage des planches élimine les cellules vivantes du consortium présent sur les planches, sans autre modification des composés prélevés dans la suspension de décrochage. En effet, la filtration (45µm) ne modifie pas la partie non microbienne de la suspension. L'inhibition de croissance observée dans nos conditions expérimentales (Figure IV.5) semble donc **liée à la présence du consortium vivant décroché de la planche d'affinage native et non à la présence de molécules inhibitrices.**

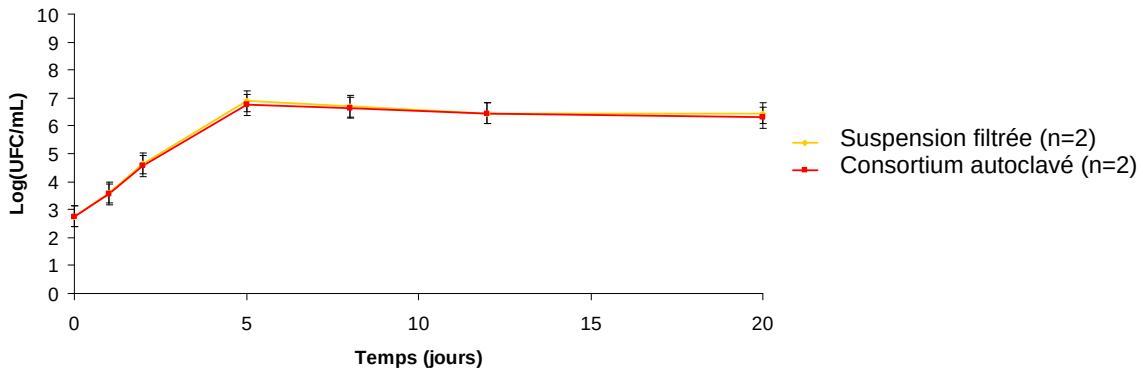


Figure IV.6. Evolution des populations de *L. monocytogenes* (moyenne pour les souches 162 et 481) à 15°C dans des suspensions de décrochage de planches natives, filtrées (0,45µm) (suspension filtrée) et des suspensions de décrochage autoclavées (consortium autoclavé). Les barres d'erreur correspondent aux écart-types.

2.2 Evolution du pH dans les suspensions de décrochages

La Figure IV.7 représente l'évolution du pH à 15°C dans des suspensions de décrochage de planches natives et autoclavées. Dans les 2 cas, le pH est resté stable pendant 13 jours, proche de la neutralité, avec une légère tendance à la baisse. Cette gamme de pH permet la croissance de *L. monocytogenes*, qui peut se multiplier entre des pH de 4,6 et 9,6 (Pearson et Marth, 1990 ;

Augustin *et al*., 2005). Pour ce consortium, la présence de bactéries lactiques n'est pas associée à une chute de pH pour expliquer l'inhibition de croissance. De même, le pH de la surface des planches était aussi stable autour de la neutralité et n'avait donc pas d'influence sur la croissance de *L. monocytogenes* (cf. Chapitre 3, Paragraphe III.2.2).

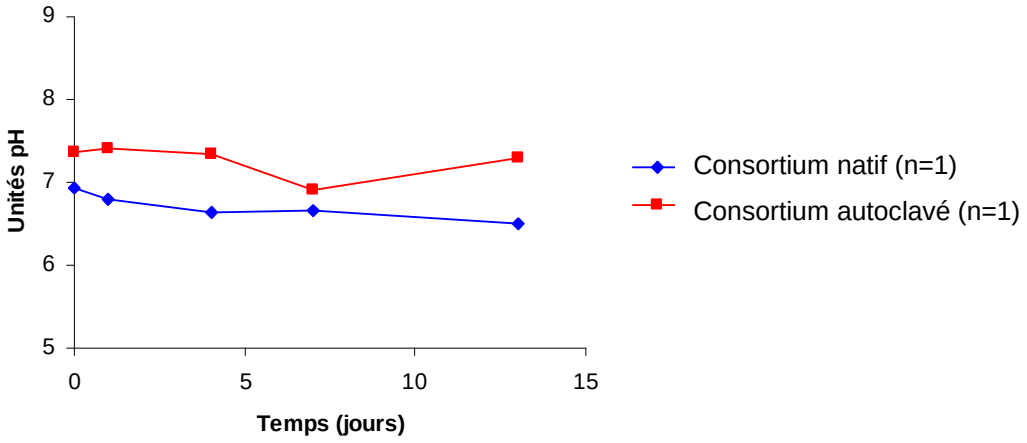


Figure IV.7. Evolution du pH à 15°C dans des suspensions de décrochage de planches natives (consortium natif) et autoclavées (consortium autoclavé).

2.3 Evolution des principales flores du consortium dans les suspensions de décrochage

La Figure IV.8 représente l'évolution de la FMAR, de la flore halophile, des levures et moisissures, des bactéries lactiques et des *Pseudomonas* spp à 15°C dans des suspensions de décrochage de planches natives pendant 13 jours. La FMAR et les flores majoritaires du consortium sont restées stables pendant l'incubation entre 7 et 8,1 Log(UFC/ml) pour la FMAR, entre 5,6 et 6,3 Log(UFC/ml) pour la flore halophile et entre 5,1 et 5,7 Log(UFC/ml) pour les levures et moisissures. Les bactéries lactiques se sont développées de 3 à 5,1 Log(UFC/ml) ainsi que les *Pseudomonas* spp de 2,3 à 7,2 Log(UFC/ml). La forte croissance des *Pseudomonas* spp est à relier avec les conditions de croissance. En effet, Les *Pseudomonas* spp sont les flores d'altération majoritaires dans les aliment à pH neutre et à forte a_w, conservés à basse températures et dans des conditions aérobies (Gram *et al*., 2002 ; Neumeyer *et al*., 1997). Par contre, lors de l'incubation à 15°C sur les échantillons de planches, tous les dénombrements des

flores dont les *Pseudomonas* spp et les bactéries lactiques étaient restés stables pendant 12 jours (cf. chapitre 3, paragraphe II.2).

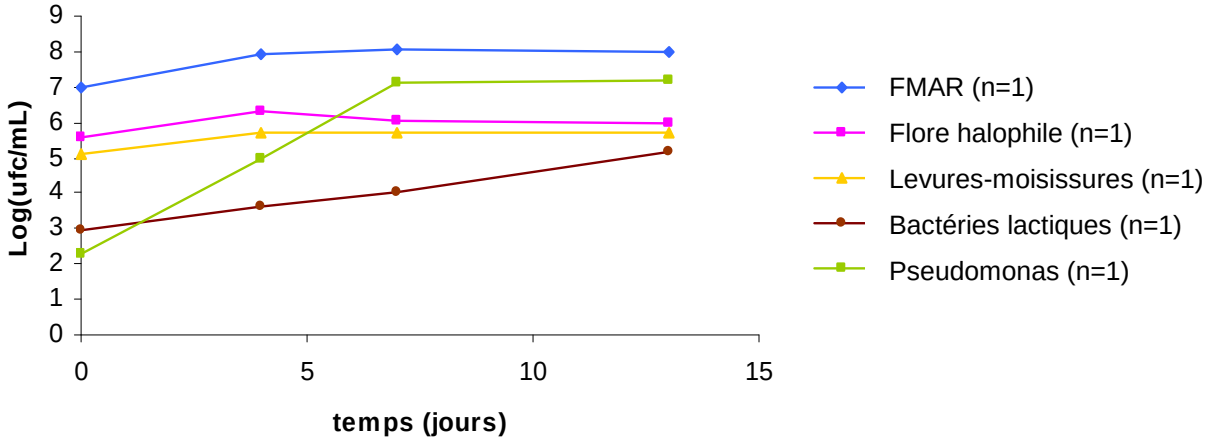


Figure IV.8. Evolution de la FMAR, de la flore halophile, des levures-moisissures, des bactéries lactiques et des *Pseudomonas* spp à 15°C dans des suspensions de décrochage de planches natives.

Ainsi, malgré la présence de molécules inhibitrices détectées dans les suspensions de décrochage au paragraphe précédent, l'inhibition de croissance observée pour ce modèle semble liée à la présence du consortium vivant prélevé sur les planches d'affinage.

La comparaison des comportements de *L. monocytogenes* sur planche d'affinage (cf. chapitre 3) et en suspension de décrochage permet d'apporter des informations sur l'effet inhibiteur observé sur les planches. La chute des populations de *Listeria* observée dans certains cas sur planches n'a pas été retrouvée dans le modèle planctonique. De même, les différences de comportement entre les 2 souches de *L. monocytogenes* n'ont pas non plus été retrouvées en modèle planctonique. Ainsi, lors du passage de biofilm sur planches en consortia planctonique, le ou les principaux mécanismes d'inhibition de croissance ont été conservés, mais certaines composantes (mécanisme adjacent, ou conditions d'applications) ont pu être modifiées et ainsi modifier les comportements de *Listeria*. Il est important de noter que le pH environnemental du consortium et

des *Listeria* n'est pas différent sur planche et en modèle planctonique (pH neutre et stable). Par contre, les conditions en modèle planctonique favorisent fortement la croissance des *Pseudomonas* spp et dans une moindre mesure la croissance des bactéries lactiques pour une même température (15°C).

3. Reconstitution du biofilm en laboratoire sur support bois et effet du consortium sur le comportement de *L. monocytogenes*

Après la reproduction de l'effet inhibiteur en modèle planctonique, un modèle biofilm sur support bois a été élaboré pour la reproduction de l'effet inhibiteur en laboratoire. Ce modèle a été conçu pour simuler le biotope d'une planche d'affinage en terme de conditions physico-chimique et de substances nutritives.

3.1. Choix du milieu d'imprégnation des faux-fonds

Le choix du milieu d'imprégnation parmi les 4 milieux sélectionnés (2 milieux reconstitués avec du lactosérum ou du prolait, du lactosérum et du TSB) a été réalisé sur plusieurs critères : l'apport nutritionnel de ces milieux, l'évolution des flores du consortium en culture dans ces milieux et l'évolution du pH des cultures.

3.1-1 Calcul de l'apport nutritionnel

La teneur des principaux constituants biochimiques des 3 milieux, les apports nutritionnels de ces milieux une fois déposés sur les faux fonds sont détaillés dans le Tableau IV.4. et comparés à l'apport nutritionnel calculé au chapitre 2.

Tableau IV.4 Comparaison des apports nutritifs des 3 milieux sur les faux fonds, suite à l'imprégnation (4 ml pour 265 cm²) et au dépôt (1 ml pour 64 cm²), comparativement aux substances nutritives présentes sur planche de fin d'affinage.

Analyse (mg/cm²)	Méthode	Sur planche de fin d'affinage	Lactosérum, sur faux fond	Milieu reconstitué Prolait, sur faux fond	Milieu reconstitué lactosérum, sur faux fond
D-Lactate	Enzymatique	$5,8\ 10^{-3}$	$3,1\ 10^{-5}$	$2,0\ 10^{-2}$	$1,3\ 10^{-2}$
L-Lactate	Enzymatique	$1,8\ 10^{-2}$	$3,8\ 10^{-3}$	$3,2\ 10^{-3}$	$1,4\ 10^{-2}$
Lactose	Enzymatique	< 2	14,4	0,15	0,12
Galactose	Enzymatique	< 2	$4,0\ 10^{-2}$	$< 6,0\ 10^{-2}$	$< 6,0\ 10^{-2}$
Matière grasse	NF EN ISO 1211, 2004	$3,0\ 10^{-2}$	$7,6\ 10^{-3}$	$5,4\ 10^{-3}$	$4,7\ 10^{-3}$
Azote total	FIL 20-2, 2002	$4,0\ 10^{-2}$	1,6	$4,8\ 10^{-2}$	$8,3\ 10^{-2}$

Le lactosérum apporterait trop de lactose et trop d'azote total, mais pas assez de matière grasse. Les milieux reconstitués avec du Prolait et du lactosérum apporteraient assez de nutriments carbonés et azotés, mais seraient déficitaire en matière grasse.

3.1-2 Suivis de croissance de quatre flores du consortium mis en culture dans les milieux à tester

Les évolution de 4 flores (FMAR, flore halophile, *Geotrichum candidum* et levures) d'un consortium mis en culture à 15°C, avec un repiquage à 10% (v/v) à 48h dans du milieu reconstitué–Prolait, du milieu reconstitué–lactosérum, du lactosérum et du TSB sont représentées sur la Figure IV.9. Pour les 2 milieux reconstitués, les 4 flores sont restées stables entre 5,6 et 6,7 Log(UFC/ml) pour la FMAR, entre 5,3 et 6,5 Log(UFC/ml) pour la flore halophile, entre 2,6 et 4,1 Log(UFC/ml) pour les *G. candidum* et entre 2,3 et 3,5 Log(UFC/ml) pour les levures, sauf 48 h après le repiquage pour la FMAR et les levures (7,7 et 4,4 Log(UFC/cm²) respectivement. Pour le lactosérum, la flore halophile et les *G. candidum* sont restés stables entre 4,8 et 5,8 Log(UFC/ml) et 3,1 et 4,1 Log(UFC/ml) respectivement, alors que les levures se sont développées (de 4,4 à 6,0 Log(UFC/ml)) ainsi que la FMAR (de 6,1 à 8,3 Log(UFC/ml)). L'équilibre des flores a donc été modifié. Pour le TSB, alors que la flore halophile et les levures sont restées stables, entre 5,3 et 6,3 Log(UFC/ml) et 3,6 et 4,9 Log(UFC/ml) respectivement, la populations des *G. candidum* a diminué de 3,9 à 2,9 Log(UFC/ml) et la FMAR s'est développée de 6,1 à 8,8 Log(UFC/ml).

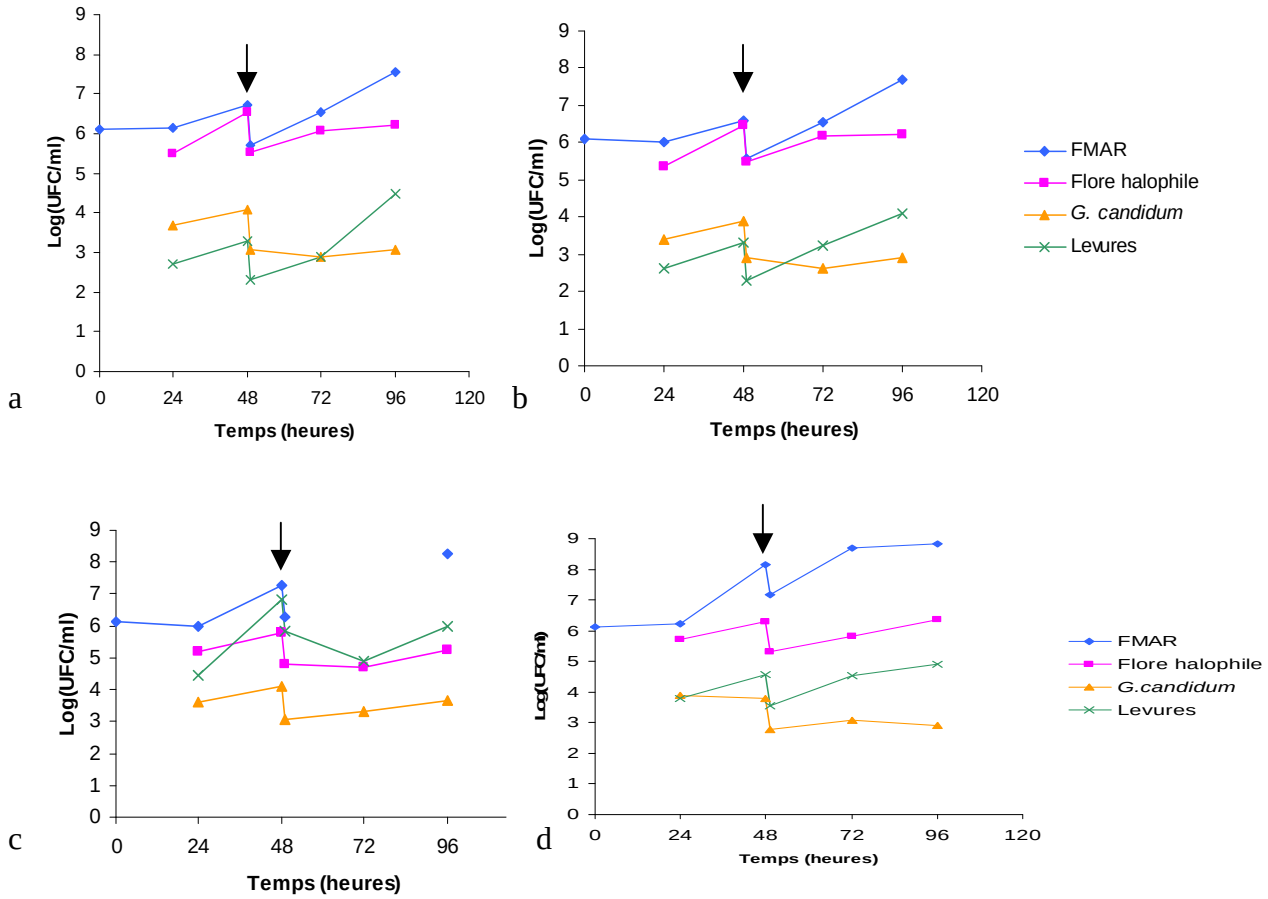


Figure IV. 9. Evolution de 4 flores (FMAR, flore halophile, *Geotrichum candidum* et levures) d'un consortium mis en culture à 15°C avec un repiquage (flèche ↓) à 10% (v/v) à 48h) dans 4 milieux liquides : milieu reconstitué–Prolait (a), milieu reconstitué–lactosérum (b), lactosérum (c) et TSB (d).

Les 2 milieux reconstitués sont ceux qui ont le moins perturbé l'équilibre de flores dénombrées lors de cet essai de culture en milieu liquide. En effet, pour une planche au stade fin d'affinage, les populations des consortia sont habituellement de 7 à 8 Log(UFC/cm²) pour la FMAR, d'environ 6 Log(UFC/cm²) pour les levures-moisissures et de 4 à 6 Log(UFC/cm²) pour la flore halophile. La variabilité des populations des *Pseudomonas* spp et des bactéries lactiques est beaucoup plus importante : leur populations peuvent être comprises entre 0 et 5 Log(UFC/cm²).

3.1-3 Evolution du pH des cultures du consortium dans les 4 milieux à tester

L'évolution des pH de cultures d'un consortium dans 4 milieux liquides (milieu reconstitué–Prolait, milieu reconstitué–lactosérum, lactosérum et TSB) à 15°C avec un repiquage à 10% (v/v) à 48h sont représentés sur la Figure IV.10. Pendant les premières 48h, les pH des cultures des milieux reconstitués étaient compris entre 6,4 et 7,5. Pour la culture dans le lactosérum, le pH était plus bas, compris entre 5,9 et 6,4, ce qui est à mettre en relation avec la présence de lactose, transformé en acide lactique par les bactéries lactiques. Après le repiquage, les pH des 4 cultures chutent de 6,6 à 5,5 pour les 2 milieux reconstitués, de 6,2 à 5,0 pour le lactosérum et de 7,2 à 5,9 pour le TSB. Il est important de noter qu'à la différence du lactosérum, pour les 2 milieux reconstitués et le TSB, le pH s'est stabilisé 48h après le repiquage.

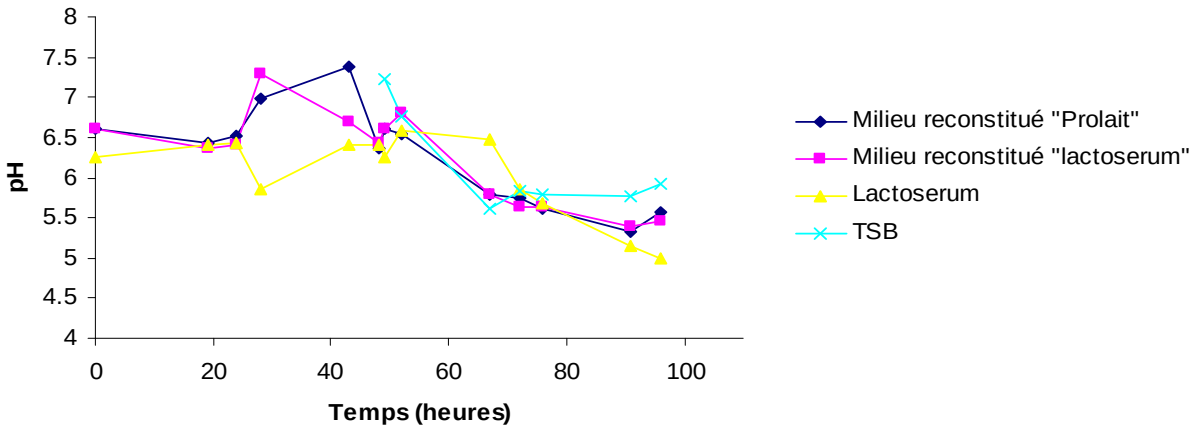


Figure IV.10. Evolution du pH de culture d'un consortium dans 4 milieux liquides (milieu reconstitué–Prolait, milieu reconstitué–lactosérum, lactosérum et TSB) à 15°C avec un repiquage à 10% à 48h.

En conclusion, le milieu le milieu reconstitué–Prolait a été choisi, en raison de ses apports nutritionnels les plus proches des teneurs mesurés à la surface des planches de fin d'affinage et de la stabilité des flores du consortium en culture liquide. Cependant, en raison de la chute de pH enregistrée lors des essais de culture liquide et du pH de 4,5 mesuré à la surface des faux fonds avant imprégnation, le milieu d'imprégnation a du être tamponné. Le tampon dihydrogénophosphate de potassium/ hydrogenophosphate de disodium a été choisi pour son pH

(pH 7) et son absence d'activité antibactérienne. 200 ml de tampon ont été ajouté par litre de milieu, afin de conserver des valeurs de pH proches de la neutralité à la surface des faux fonds, comme celles observées à la surface des planches au stade fin d'affinage.

3.2 Suivi des paramètres physico-chimiques pendant 12 jours à 15°C

Afin de se rapprocher du biotope de surface des planches d'affinage, les caractéristiques physico-chimiques de surface des faux-fonds ont été mesurés et comparés avec celles mesurées sur les planches au stade fin d'affinage. Deux consortia (A et B) issus de planches avec des fromages de l'origine C ont été inoculés sur des faux-fonds. Ces cultures pures ont permis de suivre le pH et l'a_w de surface des faux fonds pendant 14 jours d'incubation à 15°C. Les résultats sont présentés sur la Figure IV.11. Les consortia ont été inoculés à J0 sur les faux fonds et à J2, 2ml de TSB 1/20ème ont été déposés pour simuler l'inoculation par les *Listeria*. Pour les 2 consortia, les valeurs de pH de surface ont augmenté régulièrement pendant les 14 jours d'incubation, de 5,8 à 7,5 pour le consortium A et de 6,5 à 8,5 pour le consortium B. Les valeurs d'a_w ont fortement progressé entre J1 et J3, de 0,95 à 0,98 suite au dépôt des 2 ml de TSB1/20ème, puis ont diminué entre J3 et J14 jusqu'à 0,95. Ainsi, les valeurs de pH et d'a_w mesurés sur les faux fonds sont dans les limites des pH et des a_w mesurés dans le chapitre 2 sur les planches de fin d'affinage : de 6,5 à 8,5 pour les valeurs de pH et de 0,94 à 0,98 pour les valeurs d'a_w, à l'exception de la valeur de pH mesurée à J1 pour le consortium A. Ainsi, même si les évolutions notamment du pH sont différentes entre les faux fonds et les planches, les valeurs physico-chimiques sont équivalentes durant la période d'incubation. Le modèle faux fond est donc validé d'un point de vue des valeurs physico-chimiques de surface des faux fonds pour une durée de 15 jours d'incubation à 15°C.

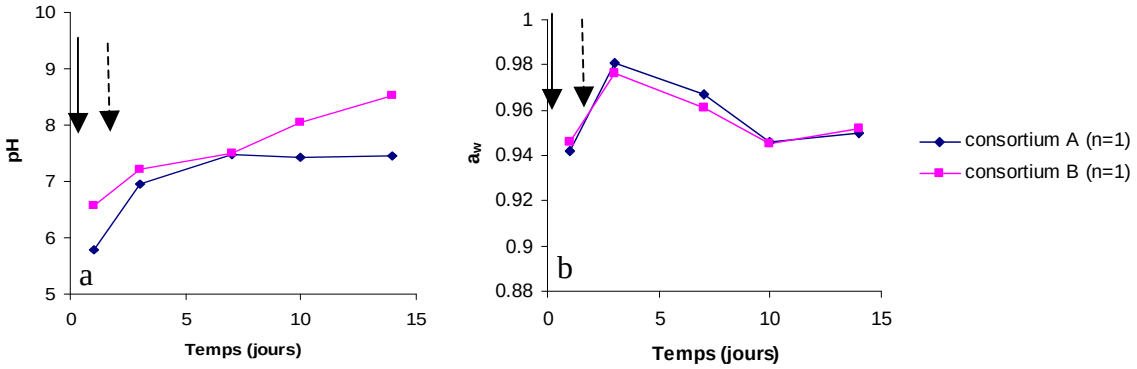


Figure IV.11. Evolution des paramètres physico-chimiques de surface des faux fonds pendant 12 jours à 15°C, après inoculation des consortia A et B à J0 (flèche pleine ↓) et dépôt de 2 ml de TSB1/20ème à J2 (flèche en pointillés ↓) : pH (a) et a_w (b).

3.3 Comportement de *L. monocytogenes* en co-culture avec des consortia réimplantés sur les faux fonds

Suite à la reproduction des conditions du biotope, le comportement de *L. monocytogenes* a été étudié sur des faux fonds avec des consortia réimplantés. Ce comportement de *L. monocytogenes* en co-culture sur les faux fonds a été analysé avec 2 consortia. Le consortium A a été prélevé et cryoconservé 1 semaine à -80°C avant le début des co-cultures, sans démonstration préalable d'un effet inhibiteur de la planche d'affinage envers *L. monocytogenes*. Le consortium B a été prélevé et cryoconservé 7 mois à -80°C avant les co-cultures. Les planches dont est issu le consortium B avaient montré un effet anti-*Listeria* démontré (Figures III.15 et III.16). Les 2 souches de *L. monocytogenes* (162 et 481) ont été inoculées en co-culture avec les 2 consortia et leur comportement étudié sur 2 répétitions pendant 12 jours (J1, J5, J8, J12). Les 2 souches de *L. monocytogenes* ont aussi été cultivées en culture pure et leur comportement étudié pendant 12 jours (J1, J5, J8, J12).

Les évolutions des populations de *L. monocytogenes* en co-culture avec les consortia A et B sont présentées sur la Figure IV.12. Dans tous les cas, les populations des *L. monocytogenes* se sont développés, entre J1 et J5 puis sont restées stables entre J5 et J12. Pour les 2 souches, aucune

différence n'a été mise en évidence entre les 2 consortia A et B (P < 0,05) sauf pour la souche 481 à J5 où une différence de 0,6 Log(UFC/cm²) peut être observée. L'effet inhibiteur observé sur les planches n'a donc pas été retrouvé sur le modèle faux fond, même pour le consortium B, dont la planche sur laquelle il a été prélevé, avait démontré une effet inhibiteur. Ce résultat suggère que les conditions du modèle sur faux fond tel que mis en place ne permettent pas de retrouver l'effet inhibiteur observé sur les planches.

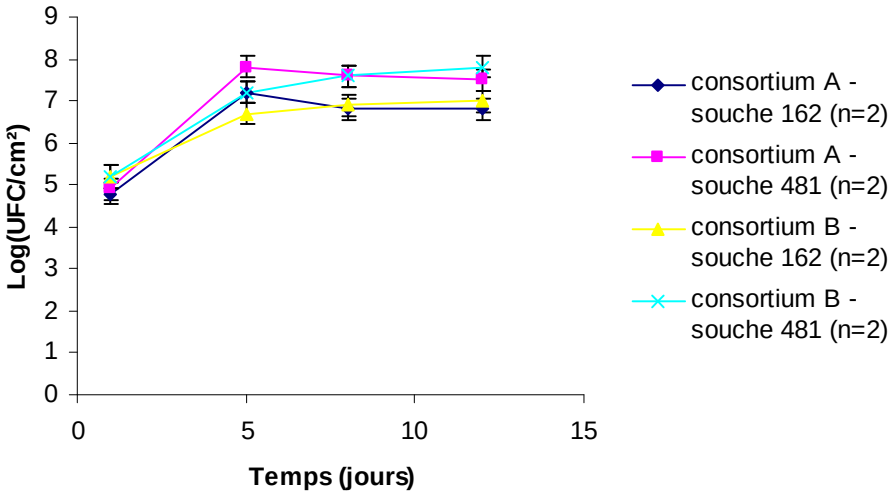


Figure IV.12. Evolution des 2 souches de *L. monocytogenes* (162 et 481) sur des faux fonds inoculés 48h avant avec des consortia (A et B), pendant 12 jours à 15°C. Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance.

Les évolutions des *L. monocytogenes* en co-culture avec les consortia A et B et en culture pure sur les faux fonds sont représentés sur la Figure IV.13. Pour la souche 481, les dénombrements en co-culture étaient supérieurs (0,4 à 0,6 Log(UFC/cm²)) aux dénombrement en culture pure à J5, J8 et J12, ce qui démontre que les consortia réimplantés sur les faux fond ne gênaient pas la croissance de la souche 481. Pour la souche 162, à J5, le dénombrement de cette souche en co-culture était supérieur de 1,2 Log(UFC/cm²) au dénombrement en culture pure. Par contre, à J8 et J12, les dénombrements de la souche 162 en culture pure étaient supérieurs de 1 et 1,2 Log(UFC/cm²) aux dénombrements en co-culture, ce qui suggère une limitation de la croissance de la souche 162 par les consortia après le 5ème jour d'incubation.

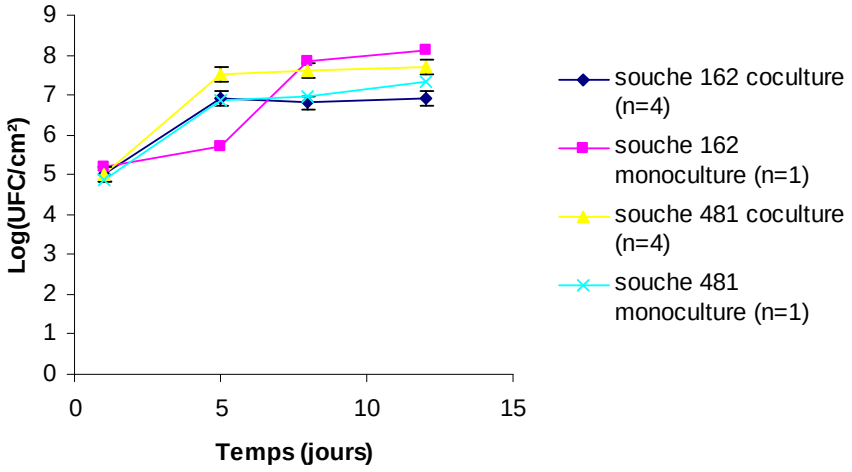


Figure IV.13. Comparaison des évolution des 2 souches de *L. monocytogenes* (162 et 481) sur des faux fonds en co-culture avec des consortia (A et B) et en culture pure pendant 12 jours à 15°C. Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance de l'analyse de variance réalisée sur les résultats des dénombrements en co-culture.

3.4 Evolution des flores présentes sur les faux fonds en co-culture pendant 12 jours à 15°C

Les évolutions des flores des consortia A et B à la surface des faux fonds après inoculation à J-2 et inoculation des 2 souches de *Listeria* à J0, pendant 12 jours à 15°C sont représentés sur la Figure IV.14. Pour les consortia A et B, les 5 flores dénombrées se sont développées durant les 14 jours d'incubation à 15°C : de 5,8 à 8,9 Log(UFC/cm²) et de 5,5 à 8,7 Log(UFC/cm²) pour la FMAR, de 5,0 à 9,8 Log(UFC/cm²) et de 4,6 à 9,0 Log(UFC/cm²) pour la flore halophile, de 3,7 à 6,5 Log(UFC/cm²) et de 3,5 à 6,9 Log(UFC/cm²) pour les levures et moisissures, de 3,9 à 7,5 Log(UFC/cm²) et de 2,8 à 8,0 Log(UFC/cm²) pour les bactéries lactiques, de 0,1 à 7,8 Log(UFC/cm²) et de 1,2 à 7,7 Log(UFC/cm²) pour les *Pseudomonas* spp.

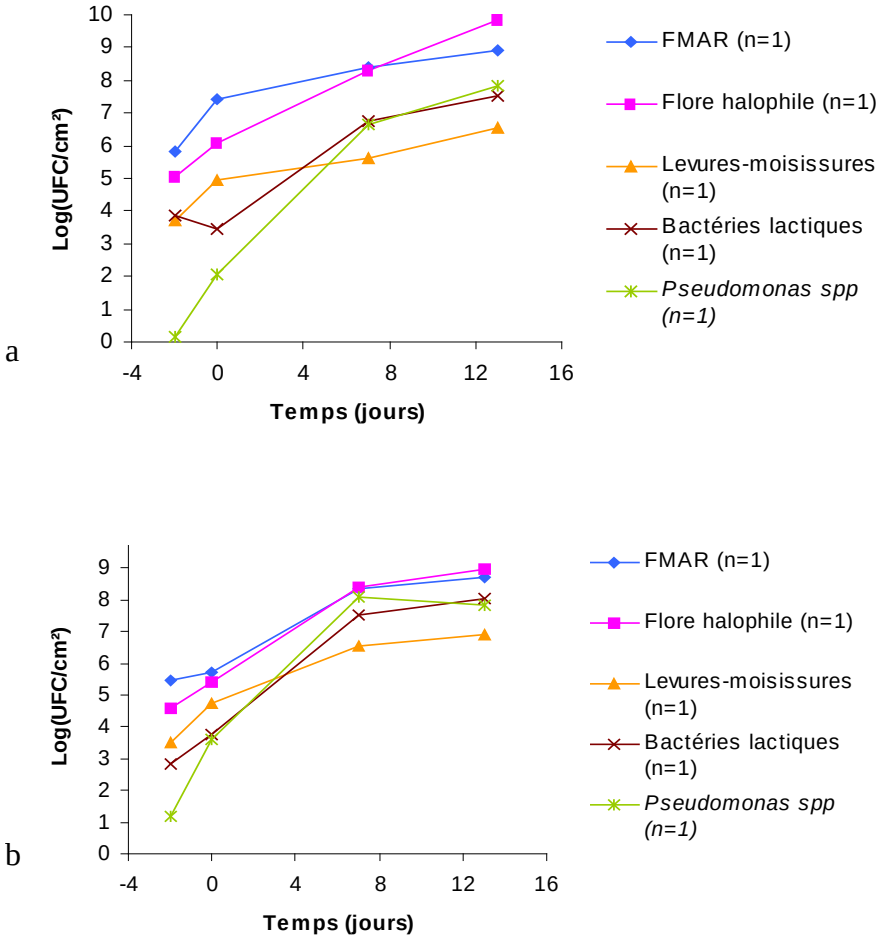


Figure IV.14. Evolution des flores des consortia A (a) et B (b) à la surface des faux fonds après inoculation à J-2 et inoculation des 2 souches de *Listeria* à J0, pendant 12 jours à 15°C.

L'évolution de ces flores sur les faux fonds est différente de l'évolution de flores présentes sur les planches d'affinage incubées à 15°C dans les enceintes étanches, qui restaient stables. (cf. paragraphe III.2.3 du chapitre 3). A la différence du modèle planctonique où seuls les bactéries lactiques et les *Pseudomonas* spp se développaient au cours de l'incubation à 15°C, sur le modèle faux fond, toutes les flores se sont développées de manière plus ou moins importante. Ce développement de toutes les flores est très certainement dû à un apport nutritif trop important. A J7 et J14, les populations des *Pseudomonas* spp et des bactéries lactiques étaient supérieures à la

population des levures–moisissures pour les 2 consortia, ce qui est une modification importante du profil microbien observé habituellement sur les planches au stade fin d'affinage. En effet, pour une planche au stade fin d'affinage, les populations des consortia sont habituellement de 7 à 8 Log(UFC/cm²) pour la FMAR, d'environ 6 Log(UFC/cm²) pour les levures-moisissures et de 4 à 6 Log(UFC/cm²) pour la flore halophile. La variabilité des populations des *Pseudomonas* spp et des bactéries lactiques est beaucoup plus importante : leur populations peuvent être comprises entre 0 et 5 Log(UFC/cm²). Ainsi à J0, le jour de l'inoculation des *L. monocytogenes*, même si les profils microbiens globaux de chaque consortium sont conservés, les dénombrements des microflores sur les faux fonds n'étaient pas équivalents aux dénombrements sur les planches de fin d'affinage. Pour le consortium A, les dénombrements de la FMAR (7,4 Log(UFC/cm²)), de la flore halophile (6,1 Log(UFC/cm²)), des *Pseudomonas* spp (2,1 Log(UFC/cm²)) et des bactéries lactiques (3,4 Log(UFC/cm²)) étaient proches des dénombrements habituels pour un stade de fin d'affinage. Pour les levures-moisissures, le dénombrement (4,9 Log(UFC/cm²)) était par contre inférieur d'environ 1 Log(UFC/cm²). Pour le consortium B, les dénombrements de la flore halophile (5,4 Log(UFC/cm²)), des *Pseudomonas* spp (3,6 Log(UFC/cm²)) et des bactéries lactiques (3,8 Log(UFC/cm²)) étaient proches des dénombrements habituels pour un stade de fin d'affinage. Pour le FMAR (5,7 Log(UFC/cm²)) et les levures-moisissures (4,7 Log(UFC/cm²)), les dénombrements étaient inférieurs de 1 à 2 Log(UFC/cm²) et d'1 Log(UFC/cm²).

Une différence d'évolution entre les 2 consortia peut être observée pour la FMAR pendant les 2 jours de la réimplantation. La FMAR du consortium A se développe plus que la FMAR du consortium B (respectivement, 1,6 et 0,3 Log(UFC/cm²)). Cette différence est probablement à relier avec la durée de cryoconservation à -80°C (1 semaine pour le consortium A et 7 mois pour le consortium B).

Pour expliquer l'absence d'inhibition de *L. monocytogenes* sur les faux fonds, les premiers éléments présentés désignent les conditions et les paramètres du modèle décrit. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour l'absence d'effet inhibiteur : un biotope et/ou des conditions de réimplantation du consortium non favorables à l'effet inhibiteur.

Certaines conditions environnementales, comme le pH et l'a_w, peuvent être écartés des causes potentielles de l'absence d'effet inhibiteur, car ces paramètres sont équivalents à ceux mesurés sur une planche de fin d'affinage. En revanche, les croissances importantes de toutes les

microflores suggèrent un apport nutritif plus important que celui disponible sur les planches de fin d'affinage. Le Tableau IV.5 présente les apports nutritionnels présents sur une planche de fin d'affinage et sur les faux fonds. Les apports en lactose et en azote total étaient effectivement supérieurs aux nutriments disponibles sur les planches de fin d'affinage. Le lait utilisé pour la cryoconservation des consortia était la principale origine du lactose et de l'azote supplémentaires. Cet apport nutritionnel trop important a pu limiter la pression nutritionnelle potentielle sur *L. monocytogenes* qui pouvait être à l'origine de l'effet inhibiteur.

Tableau IV.5. Apports nutritionnels présents sur une planche de fin d'affinage et sur un faux fond.

Analyse (mg/cm²)	Méthode	Sur planche de fin d'affinage	Apport nutritif total sur le faux fond	Apport nutritif de l'imprégnation et du dépôt	Apport nutritif du lait du dépôt
Lactate D	Enzymatique	$5,8\ 10^{-3}$	$2,0\ 10^{-2}$	$2,0\ 10^{-2}$	$7,8\ 10^{-6}$
Lactate L	Enzymatique	$1,8\ 10^{-2}$	$4,15\ 10^{-3}$	$3,2\ 10^{-3}$	$9,5\ 10^{-4}$
Lactose	Enzymatique	< 2	3,75	$1,5\ 10^{-1}$	3,6
Galactose	Enzymatique	< 2	< 0,07	$< 6,0\ 10^{-2}$	$1,0\ 10^{-2}$
Matière grasse	NF EN ISO 1211	0,03	$7,3\ 10^{-3}$	$5,4\ 10^{-3}$	$1,9\ 10^{-3}$
Azote total	ISO 8968 / FIL 20-2	0,04	0,45	$4,8\ 10^{-2}$	0,4

Malgré un apport nutritionnel trop important, à J0, le jour de l'inoculation des *L. monocytogenes*, toutes les flores n'étaient pas au niveau de dénombrement classique au stade fin d'affinage, notamment les levures-moisissures et la FMAR pour le consortium B. Ces différences de populations peuvent aussi jouer un rôle dans l'absence d'effet inhibiteur. Au cours de l'incubation, les *Pseudomonas* spp se développent de manière considérable. Or, parmi les rares cas ayant favorisé *L. monocytogenes* en co-culture en biofilm, 4 études ont montré que certaines souches de *Pseudomonas* spp pouvaient favoriser l'adhésion ou la croissance de *L. monocytogenes* (Buchanan et Bagi, 1999 ; Leriche, 1999 ; Mettler et Carpentier, 1998 ; Hassan *et al*., 2004). La présence et la croissance des *Pseudomonas* spp sont des paramètres qu'il vaut mieux maîtriser pour retrouver l'effet inhibiteur observé sur les planches d'affinage. Ainsi, la réimplantation des consortia doit être maîtrisée (durée, apport nutritif) pour obtenir des niveaux de populations plus importants,tout en respectant l'équilibre des populations entre elles. En plus

de la réimplantation, l'apport nutritionnel est aussi important à maîtriser pour la mise en évidence d'un mécanisme de compétition nutritionnelle.

IV. Discussion

La comparaison des comportements de *L. monocytogenes* sur planche d'affinage et en suspension de décrochage nous permet de démontrer une inhibition de croissance de *Listeria* liée à la présence d'un consortium microbien d'affinage actif. Par contre, la chute des populations de *Listeria* observée dans certains cas sur planches n'a pas été retrouvée dans le modèle planctonique. De même, les différences de comportement entre les 2 souches de *L. monocytogenes* n'ont pas non plus été retrouvées en modèle planctonique. Ces éléments sont en faveur de plusieurs mécanismes concomitants, qui en fonction du mode planctonique ou biofilm peuvent ou non intervenir dans l'inhibition de *L. monocytogenes*.

La présence de molécules bactériostatiques a aussi été mise en évidence dans des suspensions de décrochage lyophilisées. La réimplantation de consortium en biofilm sur des supports en bois n'a pas permis de mettre en évidence un phénomène de compétition nutritionnelle.

Pour expliquer les différences entre l'inhibition observée sur planches et en modèle planctonique, plusieurs hypothèses peuvent être envisagée. Les principales différences entre le biofilm sur planche et le consortium planctonique sont l'absence de planche en bois, le mode biofilm/planctonique des bactéries, et la présence d'un milieu liquide.

Parmi les mécanismes liés au support bois, les conditions physico-chimiques de surface des planches telles que décrites dans nos expérimentations sur planches ne semblent pas intervenir. Les huiles essentielles de l'épicéa (*Picea excelsa*) peuvent limiter la croissance de *Listeria monocytogenes* (Canillac et Mourey, 2001). Cependant, le bois d'épicéa contient moins de composants des huiles essentielles que les aiguilles de l'épicéa. De plus, l'efficacité des huiles essentielles est variable en fonction des facteurs environnementaux : l'ajout de caséinate de sodium, d'agar ou de matière grasses, ainsi que l'utilisation d'un milieu à base de fromage font diminuer l'activité anti-*Listeria*. Au contraire, un pH basique, l'addition de chlorure de sodium augmente l'effet anti-*Listeria* (Mourey et Canillac, 2004). De même, l'efficacité de certaines

huiles essentielles contre *L. monocytogenes* et *Salmonella enteritidis* varie en fonction du taux de matières grasses des fromages auquel elles sont ajoutées (Smith-Palmer *et al*., 2001). Ainsi, les molécules bactériostatiques présentes dans le lyophilisat pourraient provenir de la planche, mais dans ce cas, leur activité inhibitrice pourrait être diminuée par la matière organique présente sur la planche (résidus de fromages, matières grasses). Un autre point à prendre en compte en cas de molécules inhibitrices provenant du bois est l'influence probable de l'âge des planches. En effet, à chaque utilisation, la planche est brossée à l'eau ce qui diminue les concentrations de substances inhibitrices (hydrosolubles et dans une moindre mesure liposolubles) dans la planche au cours du temps et des utilisations. Or, sur l'ensemble du chapitre 3, l'effet inhibiteur est assez répétable pour des planches à des âges différents de 6 mois à 14 ans. En cas de mécanisme inhibiteur basé sur la présence de molécules inhibitrices du bois, des différences importantes auraient été mises en évidence pour l'effet inhibiteur. Les molécules inhibitrices du bois ne semblent donc pas être prépondérantes dans l'effet anti-*Listeria* observé sur les planches.

La différence des modes biofilm/planctonique peut intervenir directement sur la bactérie. En effet, différentes études ont mis en évidence qu'un micro-organisme en biofilm sur un support pouvait présenter de profondes modifications phénotypiques des cellules : production augmentée d'exo-polysaccharides (Sutherland, 2001), diminution du taux de croissance, variation des gènes transcrits (Donlan, 2002), plus fort taux de transfert de gènes par conjugaison (Hausner et Wuertz, 1999), et une résistance accrue aux désinfectants et agents anti-microbiens (Robbins *et al*., 2005). A partir de *L. monocytogenes* cultivées en biofilm ou en mode planctonique, Tremoulet *et al*. (2002) ont trouvé par comparaison des protéomes, 31 protéines pour lesquelles l'expression variait considérablement entre ces 2 conditions de culture. Parmi celles-ci, 9 ont été identifiées, elles interviennent dans la physiologie cellulaire, indiquant la complexité de la régulation du phénotype « biofilm ».

Le milieu liquide n'influence pas seulement les phénotypes des bactéries, il permet aussi la libre circulation des substrats, des bactéries et des substances inhibitrices en suspension ce qui engendre une homogénéisation de la suspension. Les notions de colonies ou d'éloignement géographique dans un certain rayon n'ont donc plus de signification. Or, en milieu gélosé, des colonies de *L. lactis* produisant de la nisine inhibe complètement *L. monocytogenes* pour une distance inter-colonies inférieure à 450 µm. Pour une distance inter-colonies de 1200 µm, *L.*

monocytogenes peut se développer (Thomas *et al*., 1997). Ce résultat est à mettre en relation avec l'hétérogénéité du biofilm sur les planches observée au MEB. La répartition spatiale hétérogène des bactéries du consortium sur les planches peut entraîner des variations des comportements individuels des *L. monocytogenes* inoculés sur des zones avec ou sans bactéries, et avec ou sans nutriments. Cette variation de réponse ne se retrouve pas en modèle planctonique. De plus, par rapport aux planches, il faut noter le phénomène de dilution des substances inhibitrices et des nutriments et de dispersion des bactéries. Ainsi, la phase aqueuse du biofilm sur 1 cm^2 de planche est de 0,02 ml. En mode planctonique avec consortium, elle a été diluée par le prélèvement et correspond à 3 ml de la suspension de prélèvement. Le milieu liquide modifie aussi les conditions environnementales avec une activité de l'eau qui n'est plus liée au support bois poreux mais au contenu de la suspension. Or, Hills *et al*. (2001) ont démontré l'existence d'un stress lié à la présence d'une structure poreuse par comparaison avec un milieu liquide avec la même a_w pour *S.* typhimurium LT2, *E. coli* K12 et *P. putida*. Le mécanisme de ce stress n'est pas connu, mais il peut expliquer la croissance plus importante des *Pseudomonas* spp en mode planctonique.

Malgré toutes les différences entre le mode biofilm sur planche et le mode planctonique, dans les 2 cas, une inhibition de croissance de *L. monocytogenes* est observée, qui repose sur la présence du consortium microbien vivant présent sur les planches d'affinage. Parmi les mécanismes d'inhibition que peut exercer le consortium sur *Listeria*, se trouvent la synthèse de molécules inhibitrices, la diminution de l'adhésion et la compétition nutritionnelle.

Pour les molécules inhibitrices, d'après les dénombrements des consortia présents sur les planches, plusieurs groupes microbiens peuvent synthétiser des molécules inhibitrices notamment les bactériocines et les acides organiques. De nombreuses bactéries lactiques produisent une grande diversité de bactériocines (Cleveland *et al*., 2001 ; Chen et Hoover, 2003). Pour certaines bactériocines, *L. monocytogenes* fait partie de leur spectre d'action (lactocine S, nisine, thermophiline, acidocine A, bavaricine A, curvacine A, divercine V41, enterocine A, mesentericine Y105, mundticine, pediocine PA-1, piscococine V1a, piscicocine V1b, piscicoline 126, sakacine A, sakacine P) (Chen et Hoover, 2003). Des bactéries synthétisant des bactériocines inoculées à la surface de fromages ont démontré une activité anti-*Listeria* : une pédiocine AcH, synthétisée par *Lactobacillus plantarum* WHE 92, (Ennahar *et al*.,

1998), la lacticine 3147 synthétisée par *Lactococcus lactis* DPC4275 (O'Sullivan *et al*., 2006), la micrococcine P_1 synthétisée par *Staphylococcus equorum* WS 2733, (Carnio *et al*., 2000), la linocine M18 synthétisée par *Brevibacterium linens* M18 (Eppert *et al*., 1997), une bactériocine synthétisée par *Enteroccus faecium* 7C5 (Giraffa et Carminati, 1997), et une pédiocine AcH synthétisée par *Lactobacillus plantarum* ALC 01 (Loessner *et al*., 2003). Parmi les acides organiques, l'acide lactique et l'acide acétique sont synthétisés par des bactéries lactiques (Holzapfel *et al*., 1995). L'acide phenylacétique est un composé excrété par *Geotrichum candidum* et certaines bactéries lactiques (Lactobacilles et Leuconostocs) (Dieuleveux *et al*., 1998a ; Valerio *et al*., 2004). Ces trois acides ont démontré une activité anti-*Listeria* : listéricide pour les lactates à une concentration de 14 mg/g avec un pH de 5,2 dans de la pâte de fromage (type saint nectaire) (Millet *et al*., 2005), pour l'acide phénylacétique, à 7 mg/ml, listéricide en milieu liquide, listériostatique dans du lait UHT et de la pâte de fromage (Dieuleveux et Guéguen, 1998).

Cependant, la présence de molécules uniquement bactériostatiques dans la suspension de décrochage lyophilisée, la répétabilité de l'effet anti-*Listeria* malgré les variations de flores minoritaires du biofilm sur les planches, l'absence de l'influence du taux d'inoculation (souche 481) sont autant d'arguments en défaveur des molécules inhibitrices comme mécanisme principal de l'effet anti-*Listeria*. Ces molécules peuvent néanmoins intervenir ponctuellement et expliquer les variations de l'intensité de l'effet anti-*Listeria*.

La diminution de l'adhésion de *L. monocytogenes* sur le biofilm sur planches ne semble pas être non plus le mécanisme principal, puisque l'effet inhibiteur est aussi retrouvé en mode planctonique.

Le mécanisme de compétition nutritionnelle n'a pas été systématiquement mis en évidence lors de cette étude, mais un faisceau d'arguments le désigne comme mécanisme principal : la répétabilité de l'effet anti-*Listeria*, l'importante biomasse implantée sur les planches et résistant au nettoyage –séchage, ainsi que la privation nutritionnelle mise en évidence sur la planches.

Afin d'approfondir l'hypothèse de compétition nutritionnelle, un effet « Jameson », a été recherché par L. Guillier à Massy avec des co-cultures de consortia prélevés sur les planches et *L. monocytogenes* sur des disques de fibres de verres (Tremoulet *et al*., 2002). Le suivi de la

FMAR et de 2 souches de *L. monocytogenes* (162 et 481) en co-culture sur les fibres à 15°C et 98% HR permet de détecter l'entrée simultanée en phase stationnaire de ces deux populations bactériennes. Les disques de fibres de verres étaient déposés sur des fromages ionisés de type pâte molle et croûte lavée au stade après levurage. Le matériel et méthodes et les résultats de ces expérimentations sont détaillé dans l'annexe 5. Une étude similaire a été menée en parallèle sur un consortium microbien de planche d'affinage de Munster. Les données de croissance de la souche de *L. monocytogenes* 162 en co-culture avec le consortium reblochon un effet sur le niveau maximal atteint de *L. monocytogenes* qui est inférieur par rapport à la croissance attendue en culture pure. Pour la souche de *L. monocytogenes* 481, l'effet du consortium reblochon sur le niveau maximal atteint est moins important. Une inhibition évidente de la croissance de *L. monocytogenes* de type compétition nutritionnelle n'a pas été observée pour les 2 souches de L. monocytogenes. L'allure erratique des cinétiques de croissance en co-culture pour les deux souches laisse supposer que les conditions physico-chimiques et/ou nutritionnelles sont hétérogènes sur les filtres, avec des zones sur les filtres encore favorables à la croissance de *L. monocytogenes*. Une autre hypothèse pour expliquer l'absence de mise en évidence de l'effet « Jameson » est l'apport nutritionnel plus important que sur les planches au stade fin d'affinage.

Contrairement aux travaux réalisés avec le consortium prélevé sur des planches de l'AOC reblochon, un effet « Jameson » a été démontré expérimentalement en laboratoire pour des consortia prélevés sur des planches de l'AOC munster, ce qui démontre que le mécanisme de compétition nutritionnelle intervient dans l'effet inhibiteur des planches de l'AOC munster vis à vis de *L. monocytogenes*.

V. Conclusion

Parmi les hypothèses sur le ou les mécanismes de l'effet inhibiteur observé sur les planches d'affinage, certaines ont pu être confirmées. Ainsi, la présence de molécules bactériostatiques a été démontrée dans une suspension issue d'une planche au stade fin d'affinage. Cependant, le suivi de la croissance de *L. monocytogenes* dans une suspension de décrochage avec consortium, a montré que les molécules inhibitrices ne semblaient pas être le principal mécanisme. En effet, la croissance de *L. monocytogenes* en modèle planctonique en présence du consortium vivant a

confirmé l'importance de l'activité microbiologique du consortium vivant pour l'inhibition de *Listeria*. Le modèle planctonique n'a néanmoins pas permis de retrouver toutes les caractéristiques de l'effet inhibiteur observé sur les planches d'affinage. Les reconstitutions du biofilm sur support bois et fibres de verres n'ont pas permis non plus de retrouver l'effet inhibiteur, ni de mettre en évidence le phénomène de compétition nutritionnelle. L'hypothèse principale pour expliquer cette croissance est une perte de la pression nutritionnelle par un apport nutritif trop important, ce qui a probablement aussi engendré un déséquilibre du profil microbien lors de l'incubation.

Ainsi, les travaux présentés dans ce dernier chapitre associés aux observations décrites dans le chapitre 3, permettent de suggérer l'addition de plusieurs mécanismes de l'effet inhibiteur du consortium présent sur les planches d'affinage : un principal, la compétition nutritionnelle et un complémentaire, la présence de substances inhibitrices.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives de recherche

L'objectif de cette étude était de répondre à la question du risque sanitaire des planches en bois en fromagerie vis à vis de *L.* monocytogenes, qui posée différemment peut s'écrire « Les planches d'affinage en bois utilisées pour l'affinage du reblochon de Savoie sont elles capables de s'opposer à l'implantation de *Listeria monocytogenes* ? ».

Au commencement de ce travail, il était nécessaire d'étudier l'écologie microbienne des planches d'affinage en bois. L'environnement de ces planches en caves d'affinage ainsi que les événements du cycle d'utilisation des planches (contact avec les fromages, nettoyage, séchage) ont été caractérisés dans l'univers des caves de l'affineur partenaire. La synthèse de ces informations a permis d'obtenir des données descriptives sur les différents biofilms microbiens à la surface des planches (première semaine d'affinage, fin d'affinage et après nettoyage). Des hypothèses sur l'influence de différents facteurs de variations, comme l'origine des fromages et l'âge des planches ont aussi été formulées.

Ensuite, l'étude de l'écologie microbienne de ces planches a été réalisée, après une phase de mises au point et de choix méthodologiques, concernant le mode de transport des planches, la technique de prélèvement des consortia, les mesures du pH et du taux de chlorure de sodium. L'étude de l'écologie microbienne a mis en évidence pour les planches au stade fin d'affinage, la prédominance de la flore d'intérêt technologique de surface du reblochon et les faibles dénombrements des flores indésirables. Les homogénéités des flores majoritaires par rapport à l'origine des fromages et l'âge des planches ont aussi été montrées. Les flores minoritaires n'étaient pas été influencées par l'âge des planches, mais leurs dénombrements pouvaient varier en fonction de l'origine des fromages. Les paramètres physico-chimiques de la surface des planches (pH, a_w et taux de chlorure de sodium) n'étaient pas influencés non plus par l'âge des planches mais par l'origine des fromages pour le pH et l'a_w. Les conditions environnementales au stade fin d'affinage étaient favorables à la croissance bactérienne. En plus de la similarité des flores dominantes entre la surface des planches et la croûte du reblochon, la proximité des

compositions chimiques du biofilm « fin d'affinage » et de la croûte de reblochon a aussi été démontrée.

L'influence de la gestion sanitaire des planches qui comprend un brossage mécanisé à l'eau froide suivi d'une phase de séchage a également été étudiée. Microbiologiquement, l'influence du brossage et du séchage est surtout visible sur les populations de *Geotrichum candidum*, influence confirmée par les analyses par SSCP et MEB. L'humidité et l'a_w des planches étaient aussi fortement diminuées par le séchage. Ainsi, l'a_w au stade après nettoyage n'était pas favorable à la croissance bactérienne à l'exception de la flore halophile. La spectroscopie infra-rouge a révélé la diminution des principales familles des composés biochimiques lors du nettoyage.

Par la suite, le comportement de *L. monocytogenes* inoculée sur des planches d'affinage a été étudié. Le choix de 2 souches de *L. monocytogenes* parmi 5 et l'étude des effets des modalités expérimentales sur le biotope des planches ont été réalisés. Pour chacune des 23 planches analysées dans cette partie, l'absence de *L. monocytogenes* détectable a été montrée. Une inhibition de *Listeria monocytogenes* par les planches d'affinage dans les conditions expérimentales d'affinage reproduites au laboratoire a été démontrée. Cette inhibition est liée à la présence d'un biofilm natif vivant sur ces planches, elle n'est pas observée pour des planches autoclavées. Cet effet anti-*Listeria*, actif contre les 2 souches de *L. monocytogenes* retenues, n'est pas influencé par l'origine des fromages affinés sur les planches. L'effet anti-*Listeria* peut être influencé par le taux d'inoculation en fonction de la souche de *Listeria*. Il a aussi été montré aux 2 stades de nettoyage des planches avec une meilleure efficacité au stade après nettoyage, stade le plus exposé au risque d'introduction de *L. monocytogenes* dans les caves, par le contact avec des fromages éventuellement contaminés.

La reproductibilité de l'effet anti-*Listeria* suggère un effet de la « biomasse microbienne » du biofilm présent sur les planches d'affinage, par compétition nutritionnelle. Ce mécanisme d'inhibition semble majoritaire, mais la présence de substances inhibitrices liées aux activités métaboliques des microflores ne doit pas être écartée. En effet, les variations entre l'absence de croissance et la réduction de population, jusqu'à 3 Log(UFC/cm²), en fonction du stade de prélèvement, de la souche de *L. monocytogenes* et du jour de prélèvement du biofilm, sont probablement des mécanismes cumulables, qui empêchent la croissance de *L. monocytogenes* de

façon régulière et reproductible, et dans certains cas diminuent la population initiale de ce pathogène. Les expériences réalisées au laboratoire dans cette partie suggèrent pour les 2 stades de nettoyage, l'absence d'intervention des paramètres physicochimiques (pH et a_w), et l'absence d'intervention d'un développement d'une flore spécifique inhibitrice. Pour le stade fin d'affinage, les flores minoritaires ne seraient pas à l'origine de l'effet inhibiteur, et un mécanisme de compétition nutritionnelle semble jouer un rôle majeur dans cet effet. Pour le stade après nettoyage, le mécanisme de compétition nutritionnelle proviendrait de la plus faible quantité de nutriment présents sur la planche (lessivage des éléments solubles) pour une population totale microbienne équivalente, avec néanmoins une pression nutritionnelle exercée par *Geotrichum candidum* réduite. Outre la compétition nutritionnelle, la présence de molécules inhibitrices, issues du bois ou synthétisées par certaines flores du biofilm peut aussi être envisagée, mais apparaît marginale.

Enfin, dans une dernière partie, certaines hypothèses émises précédemment ont été testées en laboratoire avec des modèles de laboratoire destinés à reproduire l'effet inhibiteur observé sur les planches d'affinage. En mode planctonique, la présence de molécules bactériostatiques a été mise en évidence dans une suspension de décrochage d'une planche au stade fin d'affinage. Cependant, lors de l'inoculation de *L. monocytogenes* directement dans une suspension de décrochage, l'effet inhibiteur est observé, lié à la présence du consortium microbien. Cet effet inhibiteur est toutefois moins important que celui observé sur les planches d'affinage. Avec le mode biofilm, reconstitué sur support bois, l'effet inhibiteur n'a pas pu être reproduit. L'apport d'une quantité trop importante de nutriments utilisés dans ce modèle est probablement de l'absence d'inhibition. Cet apport nutritif a aussi engendré un déséquilibre du profil microbien lors de l'incubation. Avec le modèle biofilm sur fibres de verre, le mécanisme de compétition nutritionnelle n'a pas pu être mis en évidence pour le consortium reblochon, malgré un effet de celui-ci sur le niveau maximal atteint par *L. monocytogenes*. L'hétérogénéité du biofilm et les conditions nutritionnelles spécifiques à la surface des disques de fibres pourrait expliquer cette absence d'inhibition par la présence de zones favorables à la croissance. A ce niveau, il est particulièrement important de souligner qu'un effet inhibiteur de *L. monocytogenes* a été démontré pour des planches d'affinage de l'AOC « Munster » par Aérial dans le cadre du programme ACTIA n°03.27. Tout comme pour les planches d'affinage de l'AOC « reblochon », les biofilms présents en surface des planches natives du munster inhibent la croissance de *L.*

monocytogenes alors que ce pathogène se développe sur les planches autoclavées. Ces résultats dans un autre contexte de surface de planche, autre fromage, autre biofilm, convergent avec ceux du reblochon. Pour les consortia prélevés en surface des planches de l'AOC « Munster », le mécanisme de compétition nutritionnelle du consortium de surface envers *L. monocytogenes* a été démontré expérimentalement en laboratoire sur le modèle biofilm sur fibres de verre.

Ainsi, au laboratoire dans des conditions expérimentales d'affinage, l'ensemble planche et consortium d'affinage préviennent le développement de *L. monocytogenes* de manière reproductible avec même pour certains biofilms et certaines souches de *L. monocytogenes*, un effet anti-*Listeria* plus important, proche de la bactéricidie. Les premières expériences pour comprendre le mécanisme de cet effet inhibiteur ont suggéré la coexistence de plusieurs mécanismes : un phénomène majeur de compétition nutritionnelle et la présence accessoire de substances inhibitrices. Cette notion de barrières multiples explique les variations de l'effet inhibiteur des *L. monocytogenes* observé sur les planches d'affinage, de l'inhibition de croissance à la décroissance de la population.

La Figure IV.15 résume l'état actuel de nos connaissances (flèches pleines) et des hypothèses envisageables pour le mécanisme inhibiteur (flèches en pointillés). Deux origines ont émergé à l'issue des travaux de cette thèse : principalement, une inhibition par le consortium et/ou une inhibition directe du bois. En effet, une inhibition de croissance de *L. monocytogenes* par la planche d'affinage est possible selon deux mécanismes envisageables : par dessiccation et dans une moindre mesure par la présence de molécules inhibitrices. Pour la dessiccation, les modalités d'inoculation des *L. monocytogenes* au laboratoire (dépôt de 2 ml) n'ont pas permis de prendre en compte ce phénomène. Mais, en caves d'affinages, les fromages sont posés sur des planches aux a_w ne permettant pas la croissance de *L. monocytogenes*. Une cinétique de l'a_w des planches en caves à partir de la pose d'un fromage permettrait de connaître la durée de cette phase non favorable à la croissance de *L. monocytogenes*. Pour les molécules inhibitrices contenues dans le bois, elles ne semblent pas intervenir dans l'effet inhibiteur de planches en cours d'utilisation. La question reste ouverte pour les planches neuves, et une recherche de ces molécules sur de la sciure de planches neuves serait intéressante. En effet, l'effet inhibiteur étant lié à la présence d'un consortium, les premières utilisations des planches sont un point critique et

la présence de molécules inhibitrices pourraient être une barrière supplémentaire de l'effet inhibiteur.

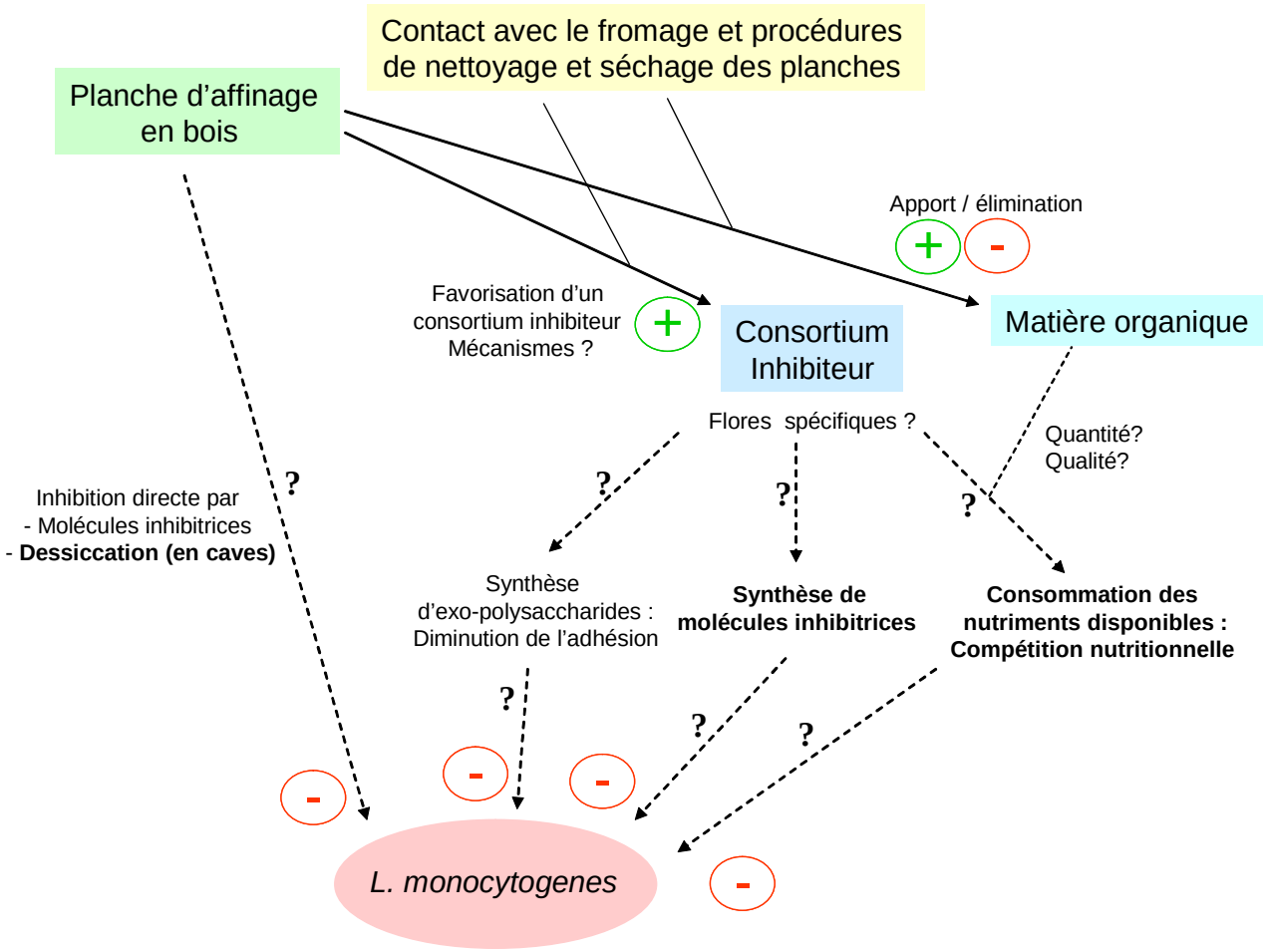


Figure IV.15. Schéma des connaissances suite à la thèse sur les relations entre les planches en bois, le consortium inhibiteur et *L. monocytogenes*. Flèches en pointillés : à confirmer.

L'inhibition directe de *L. monocytogenes* par la planche apparaît néanmoins comme un mécanisme minoritaire par rapport à l'inhibition par la présence d'un consortium vivant. Ce consortium peut exercer son effet inhibiteur selon 3 modalités, cumulables en fonction du consortium : une diminution de l'adhésion de *L. monocytogenes*, la synthèse de molécules

inhibitrices et la compétition nutritionnelle. La diminution de l'adhésion de *L. monocytogenes* n'a pas été étudiée lors de ces travaux. La reproduction de l'effet inhibiteur en modèle planctonique n'est cependant pas en faveur de ce mécanisme. Pour l'étudier, un autre mode d'inoculation doit être mis en place de manière à pouvoir récupérer les *L. monocytogenes* inoculées dans les premières heures suivant l'inoculation. La présence de molécules bactériostatiques a été démontrée dans une suspension de décrochage, pour une planche d'affinage. Reste à déterminer la fréquence de la présence de ces molécules dans les suspensions de décrochage, l'influence de l'origine des fromages sur cette fréquence et surtout la nature de ces molécules et les flores qui les synthétisent. Le mécanisme de compétition nutritionnelle n'a pas été systématiquement démontré lors de cette étude pour le consortium reblochon, mais un faisceau d'arguments le désigne comme mécanisme principal. Pour ce mécanisme, 2 éléments entrent en jeu, le consortium mais aussi les nutriments présents sur les planches. En effet, la pression nutritionnelle peut s'exercer par rapport à la quantité globale de nutriments mais aussi pour certains nutriments spécifiques. La consommation des nutriments peut aussi être réalisée par l'ensemble du consortium ou certaines flores, par exemple les *Geotrichum candidum* dont la taille des cellules impose une consommation bien supérieure pour un nombre identique de cellules bactériennes.

L'identification des conditions favorables au développement et au maintien de ce consortium inhibiteur sur les planches d'affinage devient un point essentiel. En effet, les modalités d'affinage et de gestion sanitaire des planches en bois de l'affineur partenaire permettent la mise en place et le maintien du consortium inhibiteur à la surface des planches. La pose du fromage sur les planches permettrait une recharge des planches en micro-organismes, en matière organique et en humidité. Ces éléments seraient en partie éliminés pendant la phase de nettoyage –séchage. Quel est le rôle exact du support bois dans le maintien du consortium inhibiteur ? Quels sont parmi les modalités d'affinage et de nettoyage des planches celles qui sont nécessaires et suffisantes au maintien du consortium inhibiteur et peut-être de l'équilibre des nutriments favorable à une compétition nutritionnelle ?

Ainsi, parmi les perspectives à court terme, outre l'identification d'éventuelles substances inhibitrices, la poursuite de l'élaboration d'un modèle de biofilm sur support bois peut permettre de comprendre plus précisément les mécanismes de cet effet inhibiteur. En effet, lorsque la

reproduction de l'effet inhibiteur sur faux fond sera effective, les principales conditions nécessaires pour reproduire l'inhibition auront été déterminées. Une fois ce modèle mis au point, plusieurs paramètres pourront être plus spécifiquement étudiés sur l'effet inhibiteur de *L. monocytogenes* :

- l'influence de flores spécifiques, par inoculation de certaines flores ou du consortium global avec des antifongiques, comme par exemple, l'amphotéricine B pour inhiber les levures-moisissures,

- l'influence d'une supplémentation en molécules spécifiques (glucose, fer) nécessaires à la croissance de *L. monocytogenes*

- l'influence des variations d'a_w, pour comprendre l'effet du stade après nettoyage (et séchage) sur l'effet inhibiteur,

- les comportements des différentes souches de *L. monocytogenes*, plus ou moins stressées,

- les comportements d'autres bactéries pathogènes sur le biofilm inhibiteur pour *L. monocytogenes*, comme par exemple des salmonelles, *S. aureus.*

Parmi les perspectives de ce travail pour le monde fromager, deux questions importantes sont la réalité de cet effet inhibiteur en fromagerie et la conséquence de cet effet inhibiteur décrit sur les planches d'affinage, sur le produit alimentaire en contact avec les planches à savoir le fromage. Est-ce que l'effet inhibiteur observé sur les planches est conservé si *L. monocytogenes* est inoculée par l'intermédiaire d'un fromage, malgré les nutriments qu'il peut apporter ? Est-ce que cet effet inhibiteur empêche les contaminations croisées des planches et des fromages et la dissémination du pathogène dans l'entreprise ? Une autre question est la gestion des points critiques des cycles d'utilisation des planches en bois comme les premières utilisations ou après une désinfection. La cinétique d'implantation du consortium est donc à évaluer pour cerner la durée exacte de cette phase critique. Une fois les leviers technologiques nécessaires au maintien de l'effet inhibiteur déterminés, un autre enjeu sera d'essayer d'adapter ces leviers technologiques à d'autres productions fromagères (modalités d'affinage différentes), et de donner un guide des bonnes pratiques de l'utilisation des planches d'affinage en fromagerie.

Enfin, une comparaison des comportements de *L. monocytogenes* inoculées sur des planches d'affinage en bois et sur des supports d'affinage en plastique pourrait être réalisée, avec en parallèle une comparaison sensorielle du produit affiné par un panel de consommateurs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aase B, Sundheim G, Langsrud S, Rorvik L. (2000) Occurrence an a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes. International Journal of Food Microbiology* 62:57-63

Adt I, Toubas D, Pinon JM, Manfait M, Sockalingum GD. (2006) FTIR spectroscopy as a potential tool to analyse structural modifications during morphogenesis of *Candida albicans*. *Archives Microbiology* 185: 285

Ak NO, Cliver DO, Kaspar CW. (1994) Cutting boards of plastic and wood contaminated experimentally with bacteria. *Journal of Food Protection* 57: 16-22

Al-Makhlafi H, McGuire J, Daeschel M. (1994) Influence of pre-adsorbed milk proteins on adhesion of *Listeria monocytogenes* to hydrophobic and hydrophilic silica surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3560-3565

Andersson U, Molennar D, Radström P, de Vos WM. (2005) Unity in organisation and regulation of catabolic operons in *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* and *Listeria monocytogenes*. *Systematic and Applied Microbiology* 28: 187-195

Anonyme (1945) Arrêté du 15 novembre 1945 fixant la liste des matériaux susceptibles d'être utilisés sans inconvénient pour la santé publique dans la fabrication des instruments de mesure, paru au JO du 18 novembre 1945.

Anonyme (2005a), Avis de l'AFSSA sur la classification des aliments au regard du risque représenté par *Listeria monocytogenes* et les protocoles de tests de croissance, saisine n° 2003-SA-0362.

Anonyme (1996), Décision de la commission 96/536 du 29 juillet 1996 établissant la liste des produits à base de lait pour lesquels les Etats membres sont autorisés à accorder des dérogations individuelles ou générales au titre de l'article 8 paragraphe 2 de la directive 92/46/CEE, ainsi que la nature des dérogations applicables à la fabrication de ces produits, paru le 11 septembre 1996 au Journal Officiel L 230, modifiée par la décision 97/284/CE de la commission du 25 avril 1997 paru au Journal Officiel L114 du 1er mars 1997

Anonyme (2001a) Décret du 19 janvier 2001 relatif à l'appellation d'origine contrôlée « Beaufort », paru au JO n°22 du 26 janvier 2001.

Anonyme (2002a) Décret du 2 mai 2002 relatif à l'appellation d'origine contrôlée « Chevrotin», paru au JO n°104 du 4 mai 2002.

Anonyme (2006a) Décret du 17 mai 2006 relatif à l'appellation d'origine contrôlée « Mont d'Or ou Vacherin du Haut-Doubs », paru au JO n°116 du 19 mai 2006.

Anonyme (1999a) Décret du 15 novembre 1999 relatif à l'appellation d'origine contrôlée « Reblochon de Savoie», paru au JO n°268 du 19 novembre 1999.

Anonyme (1990a) Décret du 29 juin 1990 relatif à l'appellation d'origine contrôlée « Sainte-Maure de Touraine », paru au JO n°152 du 3 juillet 1990.

Anonyme (2000a) Décret du 14 mars 2000 relatif à l'appellation d'origine contrôlée « Salers », paru au JO n°65 du 17 mars 2000.

Anonyme (1994) Décret du 8 août 1994 relatif à l'appellation d'origine contrôlée « Selles-sur-Cher», paru au JO n°187 du 13 août 1994.

Anonyme (1976) Directive n°76/769/CEE du Conseil du 27 juillet 1976 modifiée, concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des Etats membres relative à la limitation de la mise sur le marché et de l'emploi de certaines substances et préparations dangereuses.

Anonyme (1997a), FIL 180A :1997. Levains lactiques mésophiles, dénombrement des bactéries lactiques fermentant le citrate, comptage des colonies à 25°C. FIL 41, Square Vergote, 1030 Bruxelles, Belgique

Anonyme (1995) Les fromages. In *Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine*, FAO

Anonyme (2000b) Multistate Outbreak of Listeriosis. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 49: 1129-1130

Anonyme (2001b) Multistate Outbreak of Listeriosis – United States, 2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 285 (3): 285-286

Anonyme (1997b) NF EN ISO 11290, Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes.* AFNOR 11, avenue Francis de Pressensère 93571 Saint Denis La Plaine, France

Anonyme (2001c), NF ISO 16649. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* bêta-glucuronidase positive. AFNOR 11, avenue Francis de Pressensère 93571 Saint Denis La Plaine, France

Anonyme (2004a), NF EN ISO 1735, Fromages et fromages fondus : détermination de la teneur en matière grasse - Méthode gravimétrique. AFNOR 11, avenue Francis de Pressensère 93571 Saint Denis La Plaine, France

Anonyme (2002b), NF ISO 6579. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp**.** AFNOR 11, avenue Francis de Pressensère 93571 Saint Denis La Plaine, France

Anonyme (2003), NF ISO 6888-2/A1. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces) - Partie 2 : technique utilisant le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène. AFNOR 11, avenue Francis de Pressensère 93571 Saint Denis La Plaine, France

Anonyme (2002c), NF ISO 8968-1 Lait : détermination de la teneur en azote par la méthode Kjeldahl. AFNOR 11, avenue Francis de Pressensère 93571 Saint Denis La Plaine, France

Anonyme (2006b), NF V01-009-2006, Hygiène et sécurité des produits alimentaires : Lignes directrices pour la réalisation des tests de croissance microbiologique. AFNOR 11, avenue Francis de Pressensère 93571 Saint Denis La Plaine, France

Anonyme (1999b), NF V08-050 Microbiologie des aliments - Dénombrement des coliformes par comptage des colonies obtenues à 30 degrés Celsius - Méthode de routine. AFNOR 11, avenue Francis de Pressensère 93571 Saint Denis La Plaine, France

Anonyme (2004b), NF V08-057-2. Microbiologie des aliments - Méthode de routine pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive par comptage des colonies à 37 °C - Partie 2 : technique sans confirmation des colonies. AFNOR 11, avenue Francis de Pressensère 93571 Saint Denis La Plaine, France

Anonyme (1990b), Norme FAO/OMS n°A-6.

Anonyme (1998). Note d'information n° 1998-44 de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes

Anonyme (2006c) Note d'information n°2006-58 de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes du 1er mars 2006, relative aux matériaux au contact des denrées alimentaires- cas du bois.

Anonyme (2000c). Rapport de la commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes* de l'AFSSA.

Anonyme (2002d), Rapport de la DGCCRF sur la surveillance de la contamination par *Listeria monocytogenes* des aliments mis à la distribution de 1997 à 2001.

Anonyme (2005b), Règlement (CE) n°183/2005_du Parlement européen et du Conseil du 12 janvier 2005 établissant des exigences en matière d'hygiène des aliments pour animaux paru le 8 février 2005 au Journal Officiel L35

Anonyme (2004c), Règlement (CE) n° 852/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires, paru le 30 avril 2004 au Journal Officiel L139

Anonyme (2004d), Règlement (CE) n°853/2004 du Parlement Européen et du conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale, paru le 25 juin 2004 au Journal Officiel L226

Anonyme (2004e), Règlement (CE) n° 854/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine, paru le 30 avril 2004 au Journal Officiel L139

Anonyme (2004f), Règlement (CE) n° 882/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif aux contrôles officiels effectués pour s'assurer de la conformité avec la législation sur les aliments pour animaux et les denrées alimentaires et avec les dispositions relatives à la santé animale et au bien-être des animaux, paru le 30 avril 2004 au Journal Officiel L165

Anonyme (2004g) Règlement (CE) n°1935/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 27 octobre 2004 concernant les matériaux et objets destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires et abrogeant les directives 80/590/CEE et 89/109/CEE, paru au JO n°338 du 13 novembre 2004

Anonyme (2005c) Règlement (CE) n° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires, paru au JO n°338 du 22 décembre 2005.

Anonyme (2005d) Règlement (CE) n°2074/2005 de la Commission du 5 décembre 2005 établissant les mesures d'application relatives à certains produits régis par le règlement n°853/2004 et à l'organisation des contrôles officiels prévus par les règlements n°854/2004 et n°882/2004, portant dérogation au règlement n°852/2004 et modifiant les règlements n°853/2004 et n°854/2004, paru au JO n°338 du 22 décembre 2005.

Anonyme (2004h). Smear Cheese Microflora : Biodiversity and anti-listerial activity of surface microbial consortia from limburger, reblochon, livarot, tilsit and gubben cheeses. Project QLK1-CT-2001602238, 2002-2004.

Arimi SM, Ryser ET, Pritchard TJ, Donnelly CW (1997) Diversity of *Listeria* ribotypes recovered from dairy cattle, silage, and dairy processing environments. *Journal of Food Protection* 60: 811-816

Arino, S., Andolfo, S., Leitz, R., Perrier, L., and Roso, L. Détermination des températures cardinales de souches de levures par une méthode de gradient thermique dynamique. Congres de la Société Française de Microbiologie (1998, Lille).

Arizcun C, Vasseur C, Labadie JC (1998) Effect of several decontamination procedures on *Listeria monocytogenes* growing in biofilms. *Journal of Food Protection* 61: 731-734

Augustin, J.-C. Modélisation de la dynamique de croissance des populations de *Listeria monocytogenes* dans les aliments. Thèse Université Lyon 1. 1999.

Augustin J-C, Zuliani V, Cornu M, Guillier L (2005) Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. *Journal of Applied Microbiology* 99: 1019-1042

Aureli P, Giovanni CF, Caroli D, Marchiaro G, Novara O, Leone L, Salmaso S (2000) An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes. New England Journal of Medecine* 342: 1236-1241

Bagley ST, Seidler RJ, Talbot HW Jr, Morrow JE (1978) Isolation of *Klebsielleae* from within living wood. *Applied and Environmental Microbiology* 36(1):178-85.

Bailly M, Demoisy JG, Mimoud O (1994) *Précis sur le bois*.

Banwart GJ (1989) *Basic Food Microbiology*. Ed Van Nostrand Reinhold: New York

Barnes L-M, Lo MF, Adams MR, Chamberlain AHL (1999) Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4543-4548

Bärtschi C, Berthier J, Valla G (1994) Inventaire et évolution des flores fongiques de surface du Reblochon de Savoie. *Lait* 74: 105-114

Beresford MR, Andrew PW, Shama G (2001) *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *Journal of Applied Microbiology* 90: 1000-1005

Bergere JL, Tourneur C (1992) Les bactéries de surface des fromages. *Les groupes microbiens d'intérêt laitier*, ed. par Hermier J, Lenoir J, Weber F

Best MS, Kennedy ME, Coates F (1990) Efficacy of a variety of disinfectants against *Listeria* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 377-380

Bhatti M, Veeramachaneni A, Shelef LA (2004) Factors affecting the anti-listerial effects of nisin in milk. *International of Food Microbiology* 97: 215-219

Bille J (1990) Epidemiology of human listeriosis in Europe with special reference to the Swiss outbreak. *Foodborne Listeriosis*, pp. 71-74, *in:* Miller, Smith & Somkuti, 1990, New York

Bille J, Blanc DS, Schmid H, Boubaker K, Baumgartner A, Siegrist HH, Tritten ML, Lienhard R, Berner D, Anderau R, Treboux M, Ducommun JM, Malinverni R, Genné D, Erard P, Waespi U (2006) Outbreak of human listeriosis associated with Tomme cheese in Northwest Switzerland, 2005. *Eurosurveillance* 11: 91-93

Bloomfield SF, Arthur M, Van Klingeren B, Pullen W, Holah JT, Elton R (1994) An evaluation of the repeatability and reproductibility of a surface test for the activity of disinfectants. *Journal of Applied Microbiology* 76: 86-94

Bockelmann W, Hoppe-Seyler T (2001) The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. *International Dairy Journal* 11: 307-314

Bockelmann W (2002) Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal* 12: 123-131

Bockelmann W, Willems KP, Neve H, Heller KH (2005) Cultures for the ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal* 15: 719-732

Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, Call DR (2006) Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7336-7342

Bosset JO, Bütikofer U, BergerT, Gauch R (1997) Etude des composes volatils du Vacherin Fribourgeois et du Vacherin Mont d'Or. *Trav. Chim. Aliment. Hyg*. 88: 233-258

Boucher SN, Chamberlain AHL, Adams MR (1998) Enhanced survival of *Campylobacter jejuni* in association with wood. *Journal of Food Protection* 61: 26-30

Boulangé-Peterman L, Doren A, Baroux B, Bellon-Fontaine M-N (1995) Zeta potential measurements on passive metals. *Journal of colloid and interface science* 171: 179-186

Bourgeois C, Mescle JF, Zucca J (1996) *Microbiologie Alimentaire. Tome I. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments*. Ed Lavoisier. Paris.

Bourgeois CM, Larpent J-P (1996) *Microbiologie Alimentaire Tome 2. Aliments fermentés et fermentations alimentaires.* Ed Lavoisier. Paris.

Bremer PJ, Monk I, Osborne CM (2001) Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp. *Journal of Food Protection* 64: 1369-1376

Brett MSY, Short P, McLauchlin P (1998) A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. *International Journal of Food microbiology* 43: 223-229

Bréand S, Fardel G, Flandrois JP, Rosso L, Tomassone R (1998) Model of influence of time and mild temperature on *Listeria monocytogenes* nonlinear survival curves. *International Journal of Food microbiology* 40: 185-195

Briandet R, Leriche V, Carpentier B, Bellon-Fontaine MN (1999) Effects of the growth procedure on the surface hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* cells and their adhesion to stainless steel. *Journal of Food Protection* 62: 994-998

Briandet, R. Maîtrise de l'hygiène des surfaces par la création de biofilms aspects physico-chimiques. 171p. Thèse en Physico-chimie et qualité des bioproduits. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes. 1999.

Briandet R, Herry J-M, Bellon-Fontaine M-N (2001) Determination of the van der Waals, electron donor and electron acceptor surface tension components of static Gram-positive microbial biofilms. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 21: 299-310

Brisabois A, Lafarge V, Brouillaud A, de Buyser ML, Collette C, Garin-Bastuji B, Thorel MF (1997) Pathogenic organisms in milk and milk products: the situation in France and in Europe. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* 16(2):452-71

Brown JS, Holden DW (2002) Iron acquisition by Gram-positive bacterial pathogens. *Microbes and Infection* 4(11):1149-56.

Brown C, Seidler J (1973) Potential pathogens in the environment : *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma *Applied Microbiology*. 25: 900-904

Buazzi MM, Johnson ME, Marth EH (1992) Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Swiss cheese. *Journal of Dairy Science* 75: 380-386

Buchanan RL, Bagi LK (1997) Microbial competition : Effect of culture conditions on the suppression of *Listeria monocytogenes* Scott A by *Carnobacterium piscicola*. *Journal of Food Protection* 60: 254-261

Buchanan RL, Bagi LK (1999) Microbial competition : effect of *Pseudomonas fluorescens* on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* 16: 523-529

Bulbecco P, LuroP (1998) *L'essentiel sur le bois*. Ed CTBA, Paris

Burt S (2004) Essential oils : their antibacterial properties and potential applications in foods –a review. *International Journal of Food Microbiology* 94:223-253

Busscher H, Weerkamp HA, van der Mei HC, van Pelt AW, de Jong HP, Arends J (1984) Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 980-983

Callon C, Delbes C, Duthoit F, Montel MC (2006) Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Systematic and Applied Microbiology* 29: 172-180

Campredon J (1952) *Le bois : Materiaux de construction moderne*.

Canillac N, Mourey A (1993) Sources of contamination by *Listeria* during the making of semi-soft surface ripened cheese. *Sciences des Aliments* 13: 533-544

Canillac N, Mourey A (2001) Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria, Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology* 18: 261-268

Canillac N, Mourey A (2004) Effects of several environmental factors on the anti-*Listeria monocytogenes* activity of an essential oil of *Picea excelsa*. *International Journal of Food microbiology* 92: 95-103

Carel J Van Oss (1996) *Forces interfaciales en milieux aqueux*. 416p. Ed Masson, Paris

Carlton RM, Noordman WH, Biswas B, de Meester ED, Loessner MJ (2005) Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods : Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*

Carminati D, Neviani E, Ottogalli G, Giraffa G (1999) Use of surface-smear bacteria for inhibition of *Listeria monocytogenes* on the rind of smear cheese. *Food Microbiology* 16: 29-36

Carminati D, Perrone A, Neviani E, Mucchetti G (2000) Influence of traditional brine washing of smear Taleggio cheese on the surface spreading of *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection* 63: 1353-1358

Carnio MC, Eppert I, Scherer S (1997) Analysis of the bacterial surface ripening flora of german and french smeared cheeses with respect to their anti-listerial potential. *International of Food Microbiology* 47: 89-97

Carnio MC, Höltzel A, Rudolf M, Henle T, Jung G, Scherer S (2000) The macrocyclic peptide antibiotic micrococcin P1 is secreted by the foodborne bacterium *Staphylococcus equorum* WS 2733 and inhibits *Listeria monocytogenes* on soft cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2378-2384

Carpentier B (1997) Sanitary quality of meat chopping board surfaces : a bibliographical study. *Food Microbiology* 14: 31-37

Carpentier B, Chassaing D (2004) Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident micro-organisms from food industry premises. *International Journal of Food microbiology* 97: 111-122

Cerf, O. Carpentier, B. Un point critique pour la maîtrise de l'hygiène : l'environnement des ateliers. Microbiologie prédictive et HACCP (1992, Laval) Comptes rendus de la deuxième Conférence Internationale, 10-11 juin 1992, Laval. Ed A. AGMAR, pp 169-180. 1992

Cerf O, Eliaszewicz M, Lahellec C (2006) Les maladies infectieuse d'origine alimentaire en France et dans les pays industrialisés. In *La maîtrise des maladies infectieuses, un défi de santé publique, une ambition médico-scientifique*, Ed EDP Sciences pp 171-189. Les Ulis

Chae MS, Schraft H (2001) Cell viability of *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Microbiology* 18: 103-112

Chambel L, Sol M, Fernandes I, Barbosa M, Zilhao I, Barata B, Jordan S, Perni S, Shama G, Adriao A, Faleiro L, Requena T, Pelaez C, Andrew P, Tenreiro R (2007) Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. *International Journal of Food microbiology* 116: 52-63

Chamba J-F, Bonnaz G, Bourg P (1981) Comparaisons de diverses méthodes de dénombrement de la flore acidifiante du lait cru. *Lait* 61: 555-567

Chamba JF, Irlinger F (2004) Secondary and Adjunct cultures. In *Cheese : Chemistry, Physics and Microbiology*, pp 191-206. (Ed) Elsevier

Chamba JF, Beal C, Delbes C, Montel MC, Panoff JM, Thammavongs B, Thomas A (2005) Sauvegarde de *consortia* microbiens fromagers : mise au point de méthodes de conservation *ex situ* a long terme. *Les actes du BRG* 5: 393-409

Chasseignaux E, Gérault P, Toquin M-T, Salvat G, Colin P, Ermel G (2002) Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiology Letters* 210: 271-275

Chen H, Hoover DG (2003) Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2: 82-100

Chen N, Shelef LA (1992) Relationship between water activity, salts of lactic acid and growth of *Listeria monocytogenes* in a meat model system. *Journal of Food Protection* 55: 574-578

Cheroutre-Vialette M, Lebert I, Hebraud M, Labadie JC, Lebert A (1998) Effects of pH and aw stress on growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food microbiology* 42: 71-77

Choon KK, Raffael E (1990) The acidity of five hardwood species. *Holzforschung* 44: 53-58

Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML (2001) Bacteriocins : safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food microbiology* 71: 1-20

CNIEL (2006) *L'économie laitière en chiffres*. Edition 2006 CNIEL. Paris

Coleman ME, Sandberg S, Anderson SA (2003) Impact of microbial ecology of meat and poultry products on predictions from exposure assessment scenarios for refrigerated storage. *Risk Analysis* 23: 215-228

Cornu, M. Dynamique des populations bactériennes en cultures mixtes. 199 p. Thèse. Université Claude Bernard Lyon 1. 2000.

Cornu M, Pouillot R, Delignette ML (2001) Modèle de compétition entre flores pathogène et flore annexe dans un aliment. *7èmes Journées Européennes Lille-Agro-Industrie et Méthodes statistiques* Lille 2002: 25-33

Corsetti A, Rossi J, Gobetti M (2001) Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International of Food Microbiology* 69: 1-10

Cosentino S, Palmas F (1997) Hygienic conditions and microbial contamination in six ewe's milk processing plants in Sardinia in Italy. *Journal of Food Protection* 60: 283-287

Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, Palmas F (1999) In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letter in Applied Microbiology*. 29:130-135

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM (1995) Microbial biofilms. *Research in Microbiology* 147: 677-685

Coulanges V, Andre P, Vidon DJM (1998) Effect of siderophores, catecholamines, and catechol compounds on *Listeria* spp. growth in iron-complexed medium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 249: 526-530

Crandall AD, Montville TJ, (1998) Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Applied Environmental Microbiology* 64:231-237

Dalgaard P, Jorgensen LV (1998) Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* 40(1-2):105-15.

Delmas G, Le Querrec F, Weill FX, Gallay A, Espie E, Haeghebaert S, Vaillant V (2005) Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001-2003. INVS. Consulté le 20 décembre 2006, site : www.invs.santé.fr/surveillance/tiac

De Revel G, Bloem A, Augustin M, Lonvaud-Funel A, Bertrand A (2005) Interaction of *Oenococcus oeni* and oak wood compounds. *Food Microbiology* 22: 569-575

De Valk HM, Vaillant V, Jacquet C, Rocourt J, Le Querrec F, Stainer F, Quelquejeu N, Pierre O, Pierre V, Desenclos J-C, Goulet V (2001) Two consecutive nationwide outbreaks of listeriosis in France, october 1999-february 2000. *American Journal of Epidemiology* 154: 944-950

De Valk HM, Rocourt J, Lequerrec F, Jacquet C, Vaillant V, Portal H, Pierre O, Pierre P, Stainer F, Salvat G, Goulet V (2006) Bouffées épidémiques de listériose liées a le consommation de rillettes. France, Octobre-Decembre 1999, Synthèse des données disponibles au 12/01/2000. *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire* 4: 15-16

Del Campo J, Carlin F, Nguyen-The C (2001) Effect of epiphytic *Enterobacteriaceae* and Pseudomonads on the growth of *Listeria monocytogenes* in model media. *Journal of Food Protection* 64: 721-724

Demarigny Y, Beuvier E, Buchin S, Pochet S, Grappin R (1997) Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses. II. Biochemical and sensory characteristics. *Lait* 77: 151-167

Denis C, Gueguen M, Henry E, Levert D (2001) New media for the numeration of cheese surface bacteria. *Lait* 81: 365-379

Devlieghere F, Vermeiren L, Debevere J (2004) New preservation technologies : Possibilities and limitations. *International Dairy Journal* 14: 273-285

Dieuleveux V, Van Der Pyl D, Chataud J, Gueguen M (1998a) Purification and characterization of anti-*Listeria* compounds produced by *Geotrichum candidum*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 800-803

Dieuleveux V, Gueguen M (1998) Antimicrobial effect of D-3-phenylllactic acid on *Listeria monocytogenes* in TSB-YE medium, milk, and cheese. *Journal of Food Protection* 61: 1281-1285

Dieuleveux V, Lemarinier S, Gueguen M (1998b) Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenyllactic acid. *International Journal of Food microbiology* 40: 177-183

Donald AS, Fenlon DR, Seddon B (1995) The relationship between ecophysiology, indigenous microflora and growth of *Listeria monocytogenes* in grass silage. *Journal of Applied bacteriology* 79: 141-148

Donlan RM (2002) Biofilms : Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8: 881-890

Donnelly CW (2001) *Listeria monocytogenes* : a continuing challenge. *Nutr Rev* 59: 183-194

Dowe MJ, Jackson ED, Mori JG, Bell CR (1997) *Listeria monocytogenes* survival in soil and incidence in agricultural soils. *Journal of Food Protection* 60: 1201-1207

Doyle ME (2001) Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. *Food Research Institute Briefings* October 2001

Duthoit F, Godon JJ, Montel MC (2003) Bacterial community dynamics during production of Registered Designation of Origin Salers Cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3840-3848

Duthoit F, Callon C, Tessier L, Montel MC (2005) Relationships between sensorial characteristics and microbial dynamics in "Registered Designation of Origin" Salers cheese. *International Journal of Food microbiology* 103: 259-270

Dykes GA, Moorhead SM (2002) Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer or on raw beef. *International of Food Microbiology* 73: 71-81

Dykes GA (2003) Behaviour of *Listeria monocytogenes* on two processed meat products as influenced by temperature or attached growth during preincubation. *Food Microbiology* 20: 91-96

El-sayed EM, Mahfouz MB, Abdelsalam AM, Add El Gawad IA, Naim HY (2003) Antimicrobial activity of recombinant bovine lactoferrin and lactoferricin B and glycosylated human lysozyme. *Milchwissenschaft* 58: 266-270

Eliskases-Lechner F, Ginzinger W (1995) The bacterial flora of surface-ripened cheeses with special regard to coryneforms. *Lait* 75: 571-584

Ennahar S, Assobhei O, Hasselmann C (1998) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. *Journal of Food Protection* 61: 186-191

Ennahar S, Sonomoto K, Ishizaki A (1999) Class IIa Bacteriocins from Lactic acid bacteria : Antibacterial activity and food preservation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87: 705-716

Eppert I, Valdés-Stauber N, Gäutz H, Busse M, Scherer S (1997) Growth reduction of *Listeria spp*. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium linens* as evaluated in situ on soft cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4812-4817

Ericsson M, Elkow A, Danielsson-Tham ML, Loncaveric S, Mentzing LO, Person I, Unnerstand M, Tham W (1997) An outbreak of Listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 2904-2907

Ermolaeva S, Novella S, Vega Y, Ripio MT, Scortti M, Vazquez-Boland JA (2004) Negative control of *Listeria monocytogenes* virulence genes by a diffusible autorepressor. *Molecular Microbiology*. 52(2): 601-611

Farber JM, Peterkin PI (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* 55: 476-511

Farber JM, Coates F, Daley E (1992) Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes* . *Letter in Applied Microbiology* 15: 103-105

Farber JM, Daley E, Mackie MT, Limerick B (2000) A small outbreak of listeriosis potentially linked to the consumption of imitation crab meat. *Letter in Applied Microbiology* 31: 100-104

Fatemi P, Franck JP (1999) Inactivation of *Listeria monocytogenes/Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers . *Journal of Food Protection* 62: 761-765

Faure O (1997) Fromages et bois : une symbiose encore pleine de mystères. *Revue Laitière Française* 570: 14-15

Feurer C, Irlinger F, Spinnler HE, Glaser P, Vallaeys 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

Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL, Brondum J, Hayes PS, Plikaytis BD, Holmes MB, Audurier A, Broome CV, Reingold AL (1985) Pasteurized milk as a vehicle of infection in a outbreak of listeriosis. *New England Journal of Medecine* 3120: 404-407

Folsom JP, Frank JF (2006) Chlorine resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms and relationship to subtype, cell density, and planktonic cell chlorine resistance. *Journal of Food Protection* 69(6):1292-6.

Francis GA, O'Beirne (1998) Effects of storage atmosphere on *Listeria monocytogenes* and competing microflora using a surface model system. *International Journal of Food Science and Technology* 33: 467

Fredickson AG (1977) Behaviour of mixed cultures of micro-organisms. *Annual Review of Microbiology* 31: 63-87

Galli A, Franzetti L, Ottogalli G (1996) Characterization of surface bacterial microflora of Taleggio Cheese. *Enzimol* 46: 369-377

Gandhi M, Chikindas ML (2007) *Listeria* : A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food microbiology* 113: 1-15

Garcia-Graells C, Valckx C, Michiels CW (2000) Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in milk by combined treatment with high hydrostatic pressure and the lactoperoxidase system. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4137-4179

Garcia E, De Paz M, Rodriguez JL, Gaya P, Medina M, Nunez M (1996) Exogenous sources of *Listeria* contamination in raw ewe's milk. *Journal of Food Protection* 59: 950-954

Garde Cerdàn T, Ancin-Azpilicueta C (2006) Review of quality factors on wine ageing in oak barrels. *Trends in Food Science & Technology* 17: 438-447

Gay M, Amgar A (2005) Factors moderating *Listeria monocytogenes* growth in raw milk and in soft cheese made from raw milk. *Lait* 85: 153-170

Gehrig M, Schnell G, Zürcher E, Kucera LJ (2000) Hygienic aspects of wood and polyethylen cutting boards regarding food contaminations. A comparison. *Holz als Roh- und Werkstoff* 58: 265-269

Gelin BG, Broome CV (1989) Listeriosis. *Journal of American Medecine Association* 261: 1313-1320

Gilot P, Genicot A, Andre P (1996) Serotyping and esterase typing for analysis of *Listeria monocytogenes* populations recovered from foodstuffs and from human patients with listeriosis in Belgium. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1007-1010

Gimenez B, Dalgaard P (2004) Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology* 96: 96-109

Giraffa G, Carminati D (1997) Control of *Listeria monocytogenes* in the rind of Taleggio, a surface-smear cheese, by a bacteriocin from *Enterococcus faecium* 7C5. *Sciences des Aliments* 17: 383-391

Giraffa G (2003) Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food microbiology* 88: 215-222

Gnanou Besse N, Audinet N, Barre L, Cauquil A, Cornu M, Colin P (2006) Effect of the inoculum size on *Listeria monocytogenes* growth in structured media. *International Journal of Food microbiology* 110: 43-51

Gobetti M, Corsetti A (1997) *Lactobacillus sanfrancisco* a key sourdough lactic acid bacterium: a review. *Food Microbiology 14*:

Gobetti M, Morea M, Baruzzi F, Corbo MR, Matarante A, Considine T, Di Cagno R, Guinee T, Fox PF (2002) Microbiological, compositional, biochemical and texturalcharcterisation of Caciocavallo Pugliese cheese during ripening. *International Dairy Journal* 12: 511-523

Goerges S, Aigner U, Silakowski B, Scherer S (2006) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food-borne yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 313-318

Gottlieb SL, Newbern EC, Grinfin PM, Graves LM, Hoekstra RM, Baker NL, Hunter SB, Holt KG, Ramsey F, Head M, Levine P, Johnson G, Schoonmaker-Bopp D, Reddy V, Kornstein L, Gerwel M, Nsubuga J, Edwards L, Stonecipher S, Hurd S, Austin D, Jefferson MA, Young SD, Hise K, Chernak ED, Sobel J, Listeriosis Outbreak Working Group (2006) Multistate outbreak of Listeriosis linked to turkey deli meat and subsequent changes in US regulatory policy. *Clinical Infectious Diseases* 42: 29-36

Gough NL, Dodd CER (1998) The survival and disinfection of *Salmonella* typhimurium on chopping board surfaces of wood and plastic. *Food Control* 9: 363-368

Goulet V (1993) Epidémie de listériose en France. Bilan final et résultats de l'enquête épidémiologique. *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire* 4: 13-14

Goulet V, Jacquet C, Vaillant V, Rebiere I, Mouret E, Lorente C, Maillot E, Stainer F, Rocourt J (1995) Listeriosis from consumption of raw-milk cheeses. *The lancet* 345: 1581-1582

Goulet V, Rocourt J, Rebiere I, Jacquet C, Moyse C, Dehaumont P, Salvat G, Veit P (1998) Listeriosis outbreak associated with the consumption of Rillettes in France in 1993. *Journal of Infectious Diseases* 177: 155-160

Goulet, V., Jacquet, C., Laurent, E. Surveillance de la listériose en France de 2001 à 2003. Surveillance nationale des maladies infectieuses, 2001-2003. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire. 2005.

Gram L, Ravn L, Rasch M, Bruhn JB, Christenen AB, Givskov M (2002) Food spoilage-interactions betweens food spoilage bacteria. *International Journal of Food microbiology* 78: 79-97

Gravesen A, Warthoe P, Knochel S, Thirstrup K (2000) Restriction fragment differential display of pediocin-resistant *Listeria monocytogenes* 412 mutants shows consistent overexpression of a putative beta-glucoside-specific PTS system. *Microbiology* 146:1381-1389

Gravesen A, Kallipolitis B, Holmstrom K, Hoiby PE, Ramnath M, Knochel S (2004) pbp2229-mediated nisin resistance mechanism in *Listeria monocytogenes* confers cross-protection to class IIa bacteriocins and affects virulence gene expression. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1669-1679

Gueguen M, Schmidt JL (1992) Les levures et *Geotrichum candidum*. *Les groupes microbiens d'intérêt laitier*, Hermier J, Lenoir J, Weber F Coord. Ed CEPIL, Paris

Guillier L, Augustin J.C., (2006) Modelling the individual cell lag time distributions of *Listeria monocytogenes* as a function of the physiological state. *International Journal of Food Microbiology* 111 (3): 241-251.

Guinier P (1974) *Technique forestière*. Ed La Maison Rustique.

Guiraud JP (1998) *Microbiologie alimentaire*. Ed Dunod. Paris.

Harvey J, Keenan KP, Gilmour A (2007) Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology* 24: 380-392

Hassan AN, Birt DM, Franck JF (2004) Behaviour of *Listeria monocytogenes* in a *Pseudomonas putida* biofilm on a condensate-forming surface. *Journal of Food Protection* **67**: 322-327

Hausner M, Wuertz S (1999) High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3710-3713

Hilbert L.R, Bagge-Ravn D, Kold J, Gram L (2003) Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 52 (3):175-185

Hills BP, Arnould L, Bossu C, Ridge YP (2001) Microstructural factors controlling the survival of food-borne pathogens in porous media. *International Journal of Food microbiology* 66: 163-173

Holley RA, Patel D (2005) Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22: 273-292

Holzapfel WH, Geisen R, Schillinger U (1995) Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International of Food Microbiology* 24: 343-362

Houstma PC, Kusters BJM, de Wit JC, Rombouts FM, Zwietering MH (1994) Modelling growth rates of *Listeria innocua* as a function of lactate concentration. *International Journal of Food Microbiology*. 24(1-2):113-123.

Isolini D, Grand M, Glättli H (1990) Selecktivmediem zum Nachweus von obligat und fakultativ heterofermentativen Laktobazillen. *Schweiz Milchw Forachung* 19: 57-59

ITFF, étude ACTIA n°RA 97.31, «Evaluation et maîtrise du risque microbiologique dans l'utilisation du bois pour l'affinage des fromages». La Roche sur Foron. 2000.

Ito A, Sato Y, Kudo S, Sato S, Nakajima H, Toba T (2003) The screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria and their application to inactivating psychotropic food-borne pathogens. *Current Microbiology* 47: 231-236

Jacquet C, Saint Clement C, Brouille F, Catimel B, Rocourt J (1998) La listériose humaine en France en 1997-Donnees du Centre National de référence des *Listeria*. *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire* 33: 142-143

Jacquot M, Revol-Junelles AM, Milliere JB, Miclo A, Poncelet D (2000) Anti *Listeria monocytogenes* activity of the lactoperoxidase system using encapsulated substrates. *Minerva Biotecnologica* 12: 301-304

James GA, Beaudette L, Costerton JW (1995) Interspecies bacterial interactions in biofilms. *Journal of industrial microbiology* 15: 257-262

Jameson J.E. (1962) A discussion of the dynamics of *Salmonella* enrichment. *Journal of Hygiene* 60: 193-207

Jeong DK, Franck JF (1994) Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilm with micro-organisms isolated from meat and dairy processing environment. *Journal of Food Protection* 57: 576-586

Kallionen A, Vaari A, Rättö M, Konn J, Siika-aho M, Viikari L (2003) Effects of bacterial treatments on wood extractives. *Journal of Biotechnologiy* 103: 67-76

Kaprelyants AS, Kell DB (1996) Do bacteria need to communicate with each other for growth? Trends in Microbiology 4(6):237-42.

Kathariou S (2002) *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of Food Protection* 65: 1811-1829

Kennedy JEJ, Bitton G (1987) Bacteriophages in foods. In *Phage Ecology*, pp 289-316. New York

Kerouanton A. Etude de la variabilité génétique des souches de *Listeria monocytogenes* en fonction de leur origine dans différentes filières de l'industrie agro-alimentaire. 1999. Faculté de médecine, Université de Bretagne Occidentale.

Kim K-Y, Davidson PM, Chung H-J (2000) Antimicrobial effectiveness of pine needle extract on foodborne illness bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 10: 227-232

Kittson, E. A case cluster of listeriosis in Western Australia with links to pate consumption. [Eleventh International Symposium on Problems of Listeriosis. 11-14 May]. 1992.

Klaenhammer TR (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12: 39-85

Lambert RJW, Skandamis PN, Coote P, Nychas GJE (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil,thymol and carvacol. *Journal of Applied Microbiology* 91: 453-462

Langsrud S, Sidhu MS, Heir E, Holck AL (2003) Bacterial disinfectant resistance - a challenge for the food industry. *International Biodeterioration & Biodegradation* 51: 283-290

Larpent JP (2000) *Listeria*. 2ème édition. Ed Tec et DOC, Paris

Leclercq-Perlat M-N, Corrieu G, Spinnler HE (2004) The color of *Brevibacterium linens* depends on the yeast used for cheese desacidification. *Journal of Dairy Science* 87: 1536-1544

Lee S-H, Franck JF (1991) Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes* hypochlorite and heat. *Journal of Food Protection* 54: 4-6

Leite P, Rodrigues R, Ferreira M, Ribeiro G, Jacquet C, Martin P, Brito L (2006) Comparative characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Portuguese farmhouse ewe's cheese and from humans. *International Journal of Food Microbiology*. 106:111-121.

Lenoir J, Lamberet G, Schmidt JL, Tourneur C (1985) La maîtrise du bioréateur fromage. *Biofutur* 12: 23-49

Leriche V, Chassaing D, Carpentier B (1999) Behaviour of *L.monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food microbiology* 51: 169-182

Leriche, V. Minimisation de l'implantation de *Listeria monocytogenes* sur les surfaces des ateliers alimentaires par la création et l'entretien de biofilms. 1999. Université de Bourgogne.

Leriche V, Carpentier B (2000) Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *Journal of Applied Microbiology* 88: 594-605

Leriche V (2000) *Listeria monocytogenes dans les fromages*. Ed : Fédération Nationale des Appellations d'Origine Contrôlée. Poligny

Leseur JL (2006) Le Reblochon ; un fromage pédagogique. *Revue des ENIL* janvier/février: 12-17

Linnan MJ, Mascola L, Lou XD, Goulet V, May S, Salminen C, Hird DW, Yonekura ML, Hayes PS, Weaver R (1988) Epidemic listeriosis associated with Mexican-style-cheese. *New England Journal of Medecine* 319: 823-828

Loessner M, Guenther S, Stephan S, Scherer S (2003) A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1854-1857

Lopes JA (1986) Evaluation of dairy and food plant sanitizers against *Salmonella* typhimurium and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science* 69: 2791-2796

Lou Y, Yousef AE (1997) Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1252-1255

Lyytikäinen O, Ruutu PP, Mikkola J, Siitonen A, Maijala R, Hatakka M, Autio T (1999) An outbreak of listeriosis due to *Listeria monocytogenes* serotype 3a from butter in Finland. *Eurosurveillance weekly* 11 March 1999:

MacDonald PD, Whitwam RE, Boggs JD, MacCormack JN, Anderson KL, Reardon JW, Saah JR, Graves LM, Hunter SB, Sobel J (2005) Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. *Clinical Infectious Diseases* 40: 677-682

Mafu AA, Roy D, Goulet J, Magny P (1990) Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection* 53: 742-746

Mafu AA, Roy D, Goulet J, Savoie L (1991) Characterization of Physicochemical forces involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1969-1973

Makino SI, Kawamoto K, Takeshi K, Okada Y, Yamasaki M, Yamamoto S, Igimi S (2005) An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *International Journal of Food microbiology* 104: 189-196

Maoz A, Mayr R, Scherer S (2003) Temporal stability and biodiversity of two complex anti-listerial cheese-ripening microbial consortia. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4012-4018

Mariani, C., Briandet, R., Chamba, J.-F., Notz, E., Carnet-Pantiez, A., Eyoug, R.-N., and Oulahal, N. (2006) Biofilm ecology of wooden shelves used in ripening the french raw milk smear cheese reblochon de Savoie. *Journal of Dairy Science* 90:1653-1661

Marth EH (1988) Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology* 42: 165-168

Mayr R, Fricker M, Maoz A, Scherer S (2004) Anti-listerial activity and biodiversity of cheese surface cultures : influence of the ripening temperature regime. *European Food Research and Technology* 218: 242-247

Mazzotta AS, Crandall AD, Montville TJ (1997) Nisin resistance in *Clostridium botulinum* spores and vegetative cells. *Applied and Environmental Microbiology* 63:2654-2659

McLauchlin J, Hall SM, Velani SK, Gilbert RJ (1991) Human listeriosis and pate : a possible association. *Britanic Medical Journal* 303: 773-775

McLauchlin J, Mitchell RT, Smerdon WJ, Jewell K (2004) *Listeria monocytogenes* and listeriosis : a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food microbiology* 92: 15-33

Mead, P. (1999) Multisate outbreak of listeriosis traced to processed meats, August 1998- March 1999. [Center to Disease Control and Prevention], 1117-1118.

Menendez S, Godinez MR, Rodriguez-Otero JL, Centeno JA (1997) Removal of *Listeria* spp. in a cheese factory. *Journal of Food Safety* 17: 133-139

Mereghetti L, Quentin R, Marquet-Van Der Mee N, Andurier A (2000) Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5083-5086

Mettler E, Carpentier B (1998) Variations over time of microbial load and physicochemical properties of floor materials after cleaning in food industry premises. *Journal of Food Protection* 61: 57-65

Meylheuc, T. Influence de biosurfactants sur l'adhésion de *Listeria monocytogenes* à des surfaces inertes : conséquences sur la désinfection. 192 p. Thèse Université Paris XI. 2000.

Meylheuc T, Methivier C, Renault M, Herry J-M, Pradier C-M, Bellon-Fontaine M-N (2006) Adsorption on stainless steel of biosurfactants produced by gram-negative and gram-positive bacteria : consequence on the bioadhesive behaviour of *Listeria monocytogenes*. *Colloids and surfaces : biointerfaces* 50: 146-155

Michel V, Hauwuy A, Chamba JF (2001) La flore microbienne de laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. *Lait* 81: 575-592

Miettinen MK, Björkroth KJ, Korkeala HJ (1999) Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed field gel electrophoresis. *International Journal of Food microbiology* 46: 187-192

Miller AJ (1992) Combined water activity and solute effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes* . *Journal of Food Protection* 55: 414-418

Miller AJ, Call JE, Brown T (1996) Comparison of wooden and polyethylene cuttings boards : potential for the attachment and removal of bacteria from ground beef. *Journal of Food Protection* 59: 854-858

Millet L, Saubusse M, Didienne R, Tessier L, Montel MC (2005) Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. *International Journal of Food microbiology* 108: 105-114

Milling A, Kehr R, Wulf A, Smalla K (2006) Survival of bacteria on wood and plastic particles : dependence on wood species and environmental conditions. *Holzforschung* 59: 72-81

Min S, Harris LJ, Krochta JM (2005a) *Listeria monocytogenes* inhibition by whey protein films and coatings incorporating the lactoperoxidase system. *Journal of Food Science* 70:

Min S, Harris LJ, Han JH, Krochta JM (2005b) *Listeria monocytogenes* inhibition by whey protein films and coatings incorporating lysosyme. *Journal of Food Protection* 68: 2317-2325

Montel MC, Beuvier E, Hauwuy A (2003) Pratiques d'élevage, microflore du lait et qualités des produits laitiers. *INRA Productions Animales* 16: 279-282

Mosendale JR, Puech J-L (1998) Wood maturation of distilled beverages. *Trends in Food Science & Technology* 9: 95-101

Mounier J, Goerges S, Gelsomino R, Vancanneyt M, Vandemeulebroecke K, Hoste B, Brennan NM, Scherer S, Swings J, Fitzgerald GF, Cogan TM (2006) Sources of the adventitious microflora of smear-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology* 101: 668-681

Mourey A, Canillac N (2002) Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control* 13: 289-292

Naumann A, Navarro-Gonzalez M, Peddireddi S, Kües U, Polle A (2005) Fourier transform infrared microscopy and imaging : Detection of fungi in wood. *Fungal Genetics and Biology* 42: 829-835

Nelson JH (1990) Where are *Listeria* likely to be found in dairy plants? *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 10: 344-345

Nes IF, Diep DB, Havarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V, Holo H (1996) Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70: 113-128

Neumeyer K, Ross T, Thomson G, McMeekin TA (1997) Validation of model describing the effects of temperature and water activity on the growth of psychrotrophic pseudomonads. *International Journal of Food microbiology* 38: 55-63

Nilsson L, Hansen TB, Garrido P, Buchrieser C, Glaser P, Knochel S, Gram L, Gravesen A (2005) Grown inhibition of *Listeria monocytogenes* by a non bacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *Journal of Applied Microbiology* 98: 172-183

Nolan DA, Chamblin DC, Troller JA (1992) Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *International Journal of Food microbiology* 16: 323-335

Norwood DE, Gilmour A (1999) Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *Journal of Applied Microbiology* 86: 576-582

Norwood DE, Gilmour A (2000) The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *Journal of Applied Microbiology* 88: 512-520

O'Sullivan L, O'Connor EB, Ross RP, Hill C (2006) Evaluation of live-culture-producing lacticin 3147 as a treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology* 100: 135-143

Ogier JC, Lafarge V, Girard V, Rault A, Maladen V, Gruss A, Leveau JY, Delacroix-Buchet A (2004) Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturating gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5628-5643

Oh D, Marshall DL (1994) Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* by glycerol monolaurate with organic acids. *Journal of Food Science* 59: 1258-1261

Omar S, Lemonnier B, Jones N, Ficker C, Smith ML, Neema C, Towers GHN, Goel K, Arnason JT (2000) Antimicrobial activity of extracts of eastern North American hardwood trees and relation to traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 73: 161-170

Orth R, Mrozek H (1989) Is the control of *Listeria Campylobacter,* and *Yersina* a disinfection problem ? *Fleischwirtschaft* 69: 1575-1576

Oulahal-Lagsir N., Martial-Gros A., Bonneau M., Blum J L. (2003) "*Escherichia coli*-milk" biofilm removal from stainless steel surface : synergism between ultrasonic waves and enzymes. *Biofouling* 19: 159-168

Pak S-I, Sphar U, Jemmi T, Salman MD (2002) Risk factors for *Listeria monocytogenes* contamination of dairy products in Switzerland, 1990-1999. *Preventive Veterinary Medicine* 53: 55-65

Papageorgiou DK, Marth EH (1989) Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of blue cheese. *Journal of Food Protection* 52: 459-465

Park PK, Cliver DO (1996) Disinfection of household cutting boards with a microwave oven. *Journal of Food Protection* 59: 1049-1054

Pearson L-J, Marth EH (1990) *Listeria monocytogenes* -threat to a safe supply : a review. *Journal of Dairy Science* 73: 912-928

Portalier, V. *Listeria monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers, étude bibliographique. Th.D Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. 2002.

Prechter S, Betz M, Cerny G, Wegener G, Windeisen E (2002) Hygiene aspects of wooden resp. plastic cutting boards. *Holz als Roh- und Werkstoff* 60: 239-248

Premaratne RJ, Lin W-J, Johnson EA (1991) Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 3046-3048

Pritchard TJ, Flanders KJ, Donnelly CW (1995) Comparison of the incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. *International Journal of Food microbiology* 26: 375-384

Rauha J-P, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P (2000) Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food microbiology* 56: 3-12

Rehman SU, McSweeney PLH, Banks JM, Brechany EY, Muir DD, Fox PF (2000) Ripening of Cheddar cheese made from blends of raw and pasteurised milk. *International Dairy Journal* 10: 33-44

Remazeilles, C., Quillet, V., and Bernard, J. FTIR techniques applied to iron gall inked damaged paper. XVth World Conference on Non Destructive Testing 15-21 Octobre 2000 Rome, Italie.

Revol-Junelles AM, Miguindou-Mabiala R, Roger-Maigne D, Milliere JB (2000) Behaviour of *Escherichia coli* cells and *Bacillus cereus* spores on poplar wood crates by impedance measurements. *Journal of Food Protection* 68: 80-84

Richard, J. (1997) Utilisation du bois comme matériau au contact des produits laitiers. 83, 27-34. C.R. Acad. Agric.Fr. 4-2-1997.

Riedo FX, Pinner RW, Tosca ML, Carter ML, Graves LM, Reeves MW, Weaver R, Plikaytis BD, Broome CV (1994) A point-source foodborne Listeriosis outbreak : documented incubation period and possible mild illness. *Journal of Infectious Diseases* 170: 693-696

Robbins JB, Fisher CW, Moltz AG, Martin SE (2005) Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. *Journal of Food Protection* 68: 494-498

Robinson TP, Aboaba OO, Kaloti A, Ocio MJ, Baranyi J, Mackey BM (2001) The effect of the inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes International Journal of Food Microbiology*. 70:163-173.

Rocourt, J. Typage moléculaire de *Listeria monocytogenes*. *Listeria* et sécurité alimentaire (1991, Laval) (compte rendus de la conférence internationale des 13-14 juin 1991 à Laval, France) Ed AMGAR A., ASEPT, Laval], 1991 p 15-21.

Rocourt, J. Jacquet, C. Centre National de Référence pour la lysotypie et le typage moléculaire des *Listeria* : rapport pour l'année 1992. 68 p. 1993. Institut Pasteur, Paris.

Ross T, Dalgaard P, Tienungoon S (2000) Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *International Journal of Food microbiology* 62: 231-245

Rudolph M, Scherer S (2001) High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *International Journal of Food microbiology* 63: 91-98

Ryser ET, Marth EH (1987) Fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of Camembert cheese. *Journal of Food Protection* 50: 372-378

Ryser ET, Arimi SM, Donnelly CW (1997) Effect of pH on distribution of *Listeria* ribotypes in corn, hay, and grass silage. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3695-3697

Ryser ET (1999) Incidence and behaviour of *Listeria monocytogenes* in cheese and other fermented dairy products. In *Listeria and listeriosis*, Marcel Dekker (ed) pp 411-503. New York

Salo S, Ehavald H, Raaska L, Vokk R, Wirtanen G (2006) Microbial surveys in Estonian dairies. *LWT* 39: 460-471

Sanaa M (1994) Listériose et contamination du lait et des produits dérives du lait. *Point Vétérinaire* 26 :69-78

Schlech WF, Lavigne PM, Bortolussi RA, Allen AC, Haldane EV, Wort AJ, Hightower AW, Johnson SE, King SH, Nicholls ES, Broome CV (1983) Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. *New England Journal of Medecine* 308: 203-206

Schönwälder A, Kehr R, Wulf A, Smalla K (2002) Wooden boards affecting the survival of bacteria? *Holz als Roh- und Werkstoff* 60: 249-257

Sinde E, Carballo J (2000) Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylène : the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology* 17: 439-447

Silva IMM, Almeida RCC, Alves MAO, Almeida PF (2003) Occurrence of *Listeria* spp. In critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. *International Journal of Food microbiology* 81: 241-248

Smith JL, Fratamico PM, Novak JS (2004) Quorum sensing : a primer for food microbiologists. *Journal of Food Protection*, 67 (5) : 1053-1070

Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L (2001) The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology* 18: 463-470

Somers EB, Schoeni JL, Wong AC (1994) Effect of trisodium phosphate on biofilm and planktonic cells of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* typhimurium. *International Journal of Food Microbiology* 22(4):269-76.

Somers EB, Wong AC (2004) Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. *Journal of Food Protection*. 67(10): 2218-2229

Sommer, P. Modifications des équilibres microbiens au sein de biofilms colonisant les ateliers industriels fromagers. 185 p. Thèse Université de Bourgogne. 1999.

Sprong RC, Hulstein MFE, Van Der Meer R (2002) Bovine milk fat components inhibit food-borne pathogens. *International Dairy Journal* 12: 209-215

Sulakvelidze A, Barrow P (2005) Phage therapy in animals and agribusiness. In *Bacteriophages : Biology and Applications*, pp 335-380.

Sutherland IW (2001) Biofilm exo-polysaccharides : a strong and sticky framework. *Microbiology* 147: 3-9

Swaffield CH, Scott JA, Jarvis B (1997) Observations on the microbial ecology of traditional alcoholic cider storage vats. *Food Microbiology* 14: 353-461

Takhistov P, George B (2004) Linearized kinetic model of *Listeria monocytogenes* biofilm growth. *Bioprocess Biosystem Engineering*. 26(4):259-70.

Talbot HW (1979) Control of coliform bacteria in finished drinking water stored in redwood tank. *American water works association* 71: 349-353

Tebutt GM (1991) An assessment of cleaning and sampling methods for food-contact surfaces in premises preparing and selling high-risk foods. *Epidemiology and Infectiology* 106: 319-327

Thévenot D, Delignette ML, Christieans S, Vernozy-Rozand C (2005) Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *International Journal of Food microbiology* 102: 85-94

Thomas LV, Wimpenny JW, Barker GC (1997) Spatial interactions between subsurface bacterial colonies in a model system : a territory model describing the inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nisin-producing lactic acid bacterium. *Microbiology* 143: 2575-2582

Tempel van den T, Nielsen MS (2000) Effects of atmospheric conditions, NaCl and pH on growth and interactions between moulds and yeasts related to blue cheese production. *International Journal of Food microbiology* 57: 193-199

To MS, Favrin S, Romanova N, Griffiths MW (2002) Post adaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5258-5264

Tome E, Teixeira P, Gibbs PA (2006) Anti-listerial inhibitory lactic acid bacteria isolated from commercial cold smoked salmon. *Food Microbiology* 23: 399-405

Tresse O, Lebret V, Benezech T, Faille C (2005) Comparative evaluation of adhesion, surface properties, and surface protein composition of *Listeria monocytogenes* strains after cultivation at constant pH of 5 and 7. *Journal of Applied Microbiology* 101: 53-62

Trémoulet F, Duché O, Namane A, Martinie B, The European *Listeria* Genome Consortium, Labadie JC (2002) Comparison of protein patterns of *Listeria monocytogenes* grown in biofilm or in planktonic mode by proteomic analysis. *FEMS Microbiology Letters* 210: 25-31

Unnerstad H, Bannermann E, Bille J, Danielsson-Tham M, Waak E, Tham W (1996) Prolonged contamination of a dairy with *Listeria monocytogenes*. *Netherlands Milk Dairy Journal*. 50: 493-499

Valdes-Stauber N, Scherer S, Seiler H (1997) Identification of yeasts and corynéformes bacteria from the surface flora of red smear cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 34:115-129.

Vaillant V, Maillot E, Charley C, Stainer F (1998) Epidémie de Listériose, France Avril-Aout 1995. *Réseau National de Sante Publique*

Vaillant, V., De Valk, H. M., and Baron, E. Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France. Institut de Veille Sanitaire. 2004.

Valerio F, Lavermicocca P, Pascale M, Visconti A (2004) Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria : an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS Microbiology Letters* 233: 289-295

Valle J, Da Re S, Henry N, Fontaine T, Balestrino D, Latour-Lambert P, Ghigo J-M (2006) Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci* 103: 12558-12563

Vasseur C, Baverel L, Hébraud M, Labadie JC (1999) Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes* . *Journal of Applied Microbiology* 86: 469-476

Vatanyoopaisarn S, Nazli A, Dodd CER, Waites WM (2000) Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 860-863

Wang L-L, Johnson EA (1992) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 624-629

Wang S, Hart JH (1983) Heratwood extractives of *Maclura pomifera* and their role in decay resistance. *Wood and fiber science* 290-301

Welker C, Faiola N, Davis S, Maffatore I, Batt CA (1996) Bacterial retention and cleanability of plastic and wood cutting boards with commercial food service maintenance practices. *Journal of Food Protection* 60: 407-413

Wenning M, Theilmann V, Scherer S (2006) Rapid analysis of two food-borne microbial communities at the species level by Fourier-transform Infrared microspectroscopy. *Environmental Microbiology* 8: 848-857

Wirtanen G, Mattila-Sandholm T (1992) Effect of the growth phase of foodborne biofilms on their resistance to a chlorine sanitizer. part II. *Lebensmittel-Wissenchaft und Technology* 25: 50-54

Yousef AE, Marth EH (1988) Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of Colby cheese. *Journal of Food Protection* 51: 12-15

Zabel RA, Morrell JJ (1992) Wood microbiology. Decay and its prevention. 476p. San Diego. Academic Press.

Zhao T, Podtburg TC, Zhao P, Schmidt BE, Baker DA, Cords B, Doyle MP (2006) Control of *Listeria* spp. by competitive-exclusion bacteria in floor drains of a poultry processing plant. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3314-3320

ANNEXES

Annexe 1 : Enquête associée aux prélèvements des planches d'affinage

1. Questionnaire global (affineur et fermiers) associé aux sites prélevés :

Objectifs :

- Caractériser les planches d'affinage utilisées en terme d'âge et d'utilisation.
- Caractériser les cycles d'utilisation et de gestion des planches (conditions, durée d'affinage).
- Caractériser les procédures d'hygiène pratiquées (nettoyage, désinfections, séchage).
- Caractériser les régimes d'utilisation spécifiques (planches neuves, hivernées, contaminées…).

A) Caractérisation des planches utilisées

Origine ou Fournisseurs de planches neuves :…….....

Fréquence des commandes en nombre par 5 ans :…….

Nombre total de planches :……..….. % 0-2 ans :……..……% 2-5 ans :……..…….

% 5-10 ans :…… % 10-15 ans :……..….% 15-20 ans :……..……% + 20 ans :.…….

Raisons du renouvellement des planches :

Accident OUI NON Lesquels ?…….....

Contamination OUI NON Lesquels ? ……..

Autres OUI NON Quoi ? …….

Exigences pour le fournisseur (altitude et saison de coupe, origine dans le billot, type de sciage et type de séchage en durée et conditions) :

……

B) Caractérisation du cycle d'utilisation et de gestion des planches utilisées

Dans le cas où les fromages ne sont pas fabriqué sur place, combien de fromageries vous livre : ……...

A quel fréquence les livraisons ont-elles lieu (par semaine ou par mois) :……

Mentionner le cycle de livraison des fromages selon les producteurs s'il existe :…….

Les fromages une fois livrés sont-ils déposés sur une planche unique tout au long de l'affinage :
Si non, décrire le cycle de rotation des planches par fromages où par livraison :…….
……

Les emplacements fromages+planches se modifient-ils pendant l'affinage. Si oui, décrire le cycle de circulation à l'intérieur de chaque cave et sur chaque palette :……..
……

Nombre de caves d'affinage :……Volume par cave en m³ :……..……..
Système de climatisation (statique, dynamique, gaines textiles etc.) :……..
Système d'humidification de l'air (ultrasons, lavage etc.) :……..

Décrire avec un schéma simplifié le parcours des fromages de la livraison à leur expédition commerciale en signalant chaque cave et locaux utilisés.

Durée moyenne du cycle d'utilisation des planches avant / après procédure d'hygiène (nettoyage, séchage) en nombre de jour : ……..

Durée moyenne en jour du stockage des planches de la fin affinage à la réutilisation des planches (opérations d'hygiène+séchage+stockage) :……..

Conditions moyennes des cycles d'affinage pratiqués :

°C :……	% Hygrométrie :…….	Durée en j :……
°C :……	% Hygrométrie :……..	Durée en j :……
°C :……	% Hygrométrie :……..	Durée en j :……

Existe-t-il des lots de fromages particuliers ? OUI NON

Si OUI, durée du cycle avant / après opération d'hygiène (nettoyage, séchage)
du plus court en nombre de jours :……..
du plus long en nombre de jours :……

Conditions moyennes du cycle court en °C : …….. % Hygrométrie : ……..

Conditions moyennes du cycle long en °C : …….. % Hygrométrie : ……..

Système de climatisation employé dans chaque cycle (statique, dynamique, gaines textiles etc.)

Cycle court :……

Cycle long :……..

Choisissez-vous des planches particulières par rapport aux cycles court ou long :

Si OUI, âge moyen en année des planches en cycle court :…….

âge moyen en année des planches en cycle long :……..….

Choisissez-vous des producteurs de lait ou des fromageries particulièr(es) selon les cycles court ou long d'affinage des fromages ? OUI NON

Si OUI, est-ce un choix basé sur les observations de la présentation visuelle des croutages des fromages ?

OUI NON Si OUI, lesquelles ?……..

…..…….

Et est-ce que le choix des planches utilisées est particulier ? OUI NON

Si OUI, quelles particularités apparaissent adaptées pour satisfaire vos objectifs de présentation des produits en terme de planches utilisées par producteur ?.....

…….……..

Si NON, Est-ce que vous gérez vos lots de planche par producteur (1 par palette avec un jeu de planche unique en circuit fermé) ? OUI NON

Si OUI, quelles particularités apparaissent adaptées pour satisfaire vos objectifs de présentation des produits en terme de planches utilisées par producteur ?.....

…….……..

La présentation visuelle du croutage des fromages vous conduit-elle à parfois changer vos planches d'affinage ? OUI NON

Est-ce que ces variations de présentation des croutages apparaissent saisonnières ? OUI NON

Si OUI, est-ce que cela s'associe à un mode de gestion particulier des planches d'affinage utilisées ?

OUI NON

Si OUI, décrivez votre mode de gestion des planches :……..

……

Est-ce que ces variations de présentation du croutage des fromages apparaissent liées à la position des fromages dans la cave ? OUI NON

Si OUI, quels positions apparaissent fréquemment agir sur les croutages (haut, bas, fond de cave, proximité porte d'entrée, rangées murales ou centrales etc.) ?……..
…….....

Est-ce que ces écarts de présentation des croutages liés à la position dans les caves déclenchent un mode de gestion particulier des planches ? OUI NON
Si OUI, lequel (retournements, changement de position des planches etc.) :…….....…….
…….....…....

Si les planches changent de place dans la cave, de quelle manière (haut vers le bas, fond vers entrée, rangées murales à centrale etc.) :……
……..……..…….....……

Est-ce que les planches changent de place ou ont une rotation particulière par palette ou par cave ? OUI NON Si OUI, de quelle manière par palettes (fréquence de rotation en nombre par semaine, et par cycle d'utilisation ou de soins spécifiques des fromages) ?……..……..…….....……
…….....……...

Si OUI, de quelle manière par cave et entre cave (fréquence de rotation des planches ou des palettes en nombre par semaine, et par cycle d'utilisation ou de soins spécifiques des fromages) ?……..……..…….....……
…….....……...

Dans le cas d'une recherche d'un prélèvement sur planche représentatif de votre cave d'affinage, pensez-vous qu'une zone particulière de la cave soit plus représentative qu'une autre ? OUI NON
Si OUI, la ou lesquelles ?……..……..
……..……..
Autres remarques sur l'utilisation de vos planches ?……..……..……..
……..……..

C) Caractérisation des procédures d'hygiène réalisées sur les planches d'affinage

A la fin de l'affinage des lots de fromage, quelles opérations d'hygiène pratiquez-vous le plus fréquemment sur vos planches d'affinage :

Nettoyage par brossage ? OUI NON

Si OUI, Type d'eau utilisée (source, réseau, etc.) :…….. …….

Traitement éventuel de l'eau utilisée (UV, thermisation etc.) :……..

Température de l'eau en °C :……..…Durée du brossage en minutes :……...

Type de brossage (manuel, mécanisé etc.) :……...

Autre nettoyage (trempage, jets d'eau, etc.) : OUI NON

Si OUI, type d'opération réalisée :…….

…….....

Type d'eau utilisée (source, réseau, etc.) :…….. …….……

Traitement éventuel de l'eau utilisée (UV, thermisation etc.) :……..

Température de l'eau en °C :……...…Durée d'opération en minutes :……..

Après opération de nettoyage, les planches sont-elles séchées ? OUI NON

Si OUI, quel type de séchage pratiquez-vous (air libre, ventilation forcée, couloir etc.) ?.....

…….....

Durée moyenne de séchage en jour :……..

Température moyenne de séchage en °C :……..

Ce séchage varie-t-il sous certaines conditions ? OUI NON

Si OUI, lesquels (désinfection, croutage des fromages, saison, hivernage etc.) ?……..

……

(Pour chaque cas particulier, décrivez la durée de séchage en jours et le mode de séchage)

Si vous ne pratiquez pas de séchage après le nettoyage, quand réalisez-vous un séchage ?.....

…….....

Après nettoyage, utilisez-vous la désinfection des planches ? OUI NON

Si OUI, décrivez le mode d'utilisation du désinfectant (trempage, autre) :…….....

…….....

Durée de l'opération de désinfection en minutes :……

Type et marque du désinfectant utilisé :……...……. ……

Dose en ml % litre d'eau :…….

Mode de rinçage après désinfection des planches (trempage, autres etc.) :……...

Avec durée du rinçage en minutes :…….°C eau de rinçage :…….....

Type d'eau utilisée (source, réseau, etc.) :……..

Traitement éventuel de l'eau utilisée (UV, thermisation etc.) :……..

A quelle fréquence pratiquez-vous la désinfection des planches d'affinage en nombre / jour ou / mois ou / an :……

La désinfection est-elle liée à une saison particulière ? OUI NON

Si OUI, laquelle plus particulièrement ?…….

Si NON, décrivez la ou les causes d'une pratique de désinfection des planches (contamination, croutage etc.) :…….

…….....

Ou expliquez pourquoi la fréquence d'utilisation de la désinfection est faible :……

…….....

Après opération de désinfection éventuelle, les planches sont-elles rincées et séchées ?

OUI NON Si OUI, quel type de rinçage-séchage pratiquez-vous (air libre, ventilation forcée, couloir etc.) ?.....

…….....

Durée moyenne du rinçage en minutes :…..…… °C de l'eau :……Origine de l'eau :…….……

Type d'eau (traitement réalisé avant utilisation) :……..

°C moyenne de séchage après rinçage :…….

Durée moyenne de séchage après rinçage en jour :……

Température moyenne de séchage en °C :……..

Ce séchage varie-t-il sous certaines conditions ? OUI NON

Si OUI, lesquels (désinfection, croutage des fromages, saison, hivernage etc.) ?……..
……
(Pour chaque cas particulier, décrivez la durée de séchage en jours et le mode de séchage)

Après séchage les planches sont-elles stockées avant utilisation ? OUI NON
Si OUI, Durée moyenne en jours :…… et conditions de stockage °C :…….
% hygrométrie :……. Autres infos :……...

D) Caractérisation des régimes spécifiques d'utilisation des planches d'affinage

En cas d'introduction de planches d'affinage neuves dans vos caves, modifiez-vous les procédures habituelles d'utilisation, de nettoyage-désinfection et de séchage des planches ? OUI NON
Si OUI, quelles modifications réalisez-vous ?…..…..…….
…….....

En cas de planches d'affinage contaminées par des flores indésirables ou pathogènes dans vos caves, modifiez-vous les procédures habituelles d'utilisation, de nettoyage-désinfection et de séchage des planches ? OUI NON
Si OUI, quelles modifications réalisez-vous ?…..…..…….
…….....

En cas d'introduction de planches d'affinage hivernées en alpage dans vos caves, modifiez-vous les procédures habituelles d'utilisation, de nettoyage-désinfection et de séchage des planches ?
OUI NON
Si OUI, quelles modifications réalisez-vous ?…..…..…….
…….....

Avez-vous d'autres cas particuliers modifiant vos procédures habituelles d'utilisation et d'hygiène des planches d'affinage ? OUI NON
Si OUI, Lesquels ?……
…….....
Et quelles modifications cela entraîne-t-il dans vos pratiques ?…..…..……..……...

…….....

Autres remarques concernant vos pratiques d'utilisation et de gestion de vos planches d'affinage ?…….
……....

2. Informations associées à la collecte des échantillons de planches

Objectifs :

- Retracer l'état et l'historique des conditions d'utilisation (ambiance de cave, fromages) et de pratique des procédures d'hygiène appliquées (nettoyage, désinfection, séchage) aux planches d'affinage subissant un ou des prélèvements en cave d'affinage.

A) Caractérisation de l'état de la ou des planches au moment du prélèvement sur site

Age moyen de la ou des planche(s) prélevé(es) en années :...…….....
…….……..……..
Nom du ou des producteur(s) fermiers associé(s) à la ou les planche(s) prélevée(s) *inscrire chaque code de planches avec ses caractéristiques* :……..
……
Caractéristiques particulières de la ou des planche(s) prélevée(s) (veinage, nœuds etc.) *inscrire chaque code de planches avec ses caractéristiques* :…….
…….……..……..
Caractéristiques particulières de la ou des emprunte(s) de fromage prélevée(s) (tâches, couleur, homogénéité etc.) *inscrire chaque code de planches avec ses caractéristiques* :……..
……..……..
Position de la ou des planche(s) prélevée(s) dans la cave (haut verts bas, fond vers entrée, rangée murale ou centrale etc.) .) *inscrire chaque code de planches avec sa position* :……..
…….……..…….

B) Caractérisation des conditions d'utilisation et de gestion des planches prélevées

Durée moyenne du cycle d'utilisation avant le prélèvement en nombre de jour : …….

Conditions moyennes du cycle d'utilisation de la ou des planche(s) prélevée(s) en :

°C :…… % Hygrométrie :……. Durée en j :……Retournements en Nbre :……

°C :…… % Hygrométrie :…….. Durée en j :……Retournements en Nbre :……

°C :…… % Hygrométrie :…….. Durée en j :……Retournements en Nbre :……

Les fromages affinés sur la ou les planche(s) prélevée(s) ont-ils disposés de caractéristiques de croutage particulières ? OUI NON

Si OUI, lesquelles (tâches, couleurs, homogénéité etc.) : *inscrire chaque code de planches avec ses caractéristiques* :……
…….....

Le lot de fromages affinés sur la ou les planche(s) prélevée(s) disposaient-ils de caractéristiques particulières (pH, HFD, MG, format etc) : OUI NON

Si OUI, lesquelles ? *inscrire chaque code de planches avec ses caractéristiques* :……..……..
…….....

Quelles étaient les conditions d'ambiance en température °C, % hygrométrie et système de climatisation (statique, dynamique, gaines textiles) de la cave lors du prélèvement de la ou des planche(s) *inscrire chaque code de planches avec ses caractéristiques* :……..……...
……....

B) Caractérisation de la dernière procédure d'hygiène appliquée sur la ou les planches prélevées

Indiquer les caractéristiques de la dernière procédure de nettoyage-désinfection-séchage de la ou des planche(s) prélevée(s) ? *inscrire chaque code de planches avec ses caractéristiques* :……..……...

Si brossage, température de l'eau en °C :……Durée du brossage en minutes :…….....

Type de brossage (manuel, mécanisé etc.) :……..…….....

Si autre procédure de nettoyage (trempage, jet d'eau, cabine etc.), préciser la procédure utilisée :……..……..
…….....
Durée en minutes :……Température de l'eau en °C :..……...

Indiquer le type d'eau utilisée pour le nettoyage (source, réseau, etc.) :……
Indiquer le traitement particulier que l'eau a subit avant son utilisation pour le nettoyage (UV, thermisation etc.) :……..
…….....
Indiquer si la ou les planche(s) prélevée(s) ont subit une désinfection : OUI NON
Si OUI, décrivez le mode d'utilisation du désinfectant (trempage, autre) :…….....
…….....

Durée de l'opération de désinfection en minutes :……
Type et marque du désinfectant utilisé :……...……..
Dose en ml % litre d'eau :…….
Mode de rinçage après désinfection des planches (trempage, autres etc.) :……...
Avec durée du rinçage en minutes :…….°C eau de rinçage :…….....
Type d'eau utilisée (source, réseau, etc.) :……..
Traitement éventuel de l'eau utilisée (UV, thermisation etc.) :……..

Après opération de nettoyage et désinfection éventuelle, les planches sont-elles séchées ?
OUI NON
Si OUI, quel type de séchage pratiquez-vous (air libre, ventilation forcée, couloir etc.) ?.....
…….....

Durée moyenne de séchage en jour :……..
Température moyenne de séchage en °C :……..

Annexe 2 : Principes et modes opératoires des 2 technique de prélèvement de consortia présents sur les planches : ultrasons et brossage

1.Ultrasons

Principe

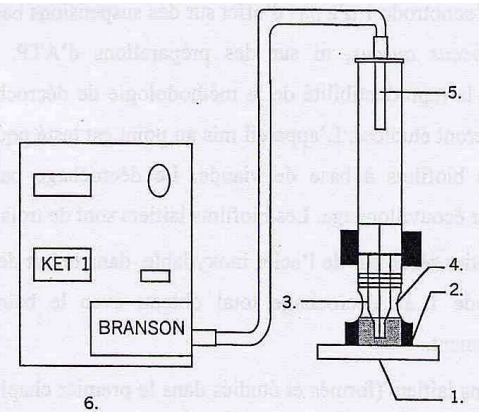
Une sonde portable d'un diamètre de 15 mm connectée à un générateur d'ultrasons (40 kHz) dispose d'une chambre de prélèvement remplie de 15 ml de liquide Ringer. Un joint en latex assure l'étanchéité de la chambre en acier inoxydable. Les ultrasons sont dirigés perpendiculairement à la surface de 10 cm² prélevée. La chambre de prélèvement peut être stérilisée à l'autoclave (15 min à 121°C).

Mode opératoire

Système de décrochage :

1. Générateur à ultrasons
2. Joint en caoutchouc
3. Sonotrode en titane
4. Chambre de prélèvement
5. Mise en route des US
6. Générateur à US

- Vérifier que le joint est bien fixé à la chambre de prélèvement (face rugueuse coté chambre).
- Fixer la chambre sur le support coté biofilm en exerçant une forte pression verticale.
- Remplir la chambre avec 15 ml de Ringer.
- Poser la sonotrode sur la chambre de prélèvement.
- Mettre le générateur en marche et appuyer sur le bouton de la sonotrode (10 secondes d'ultrasons)
- Enlever la sonotrode de la chambre et arrêter le générateur.
- Récupérer la suspension de décrochage après homogénéisation des 15 ml.



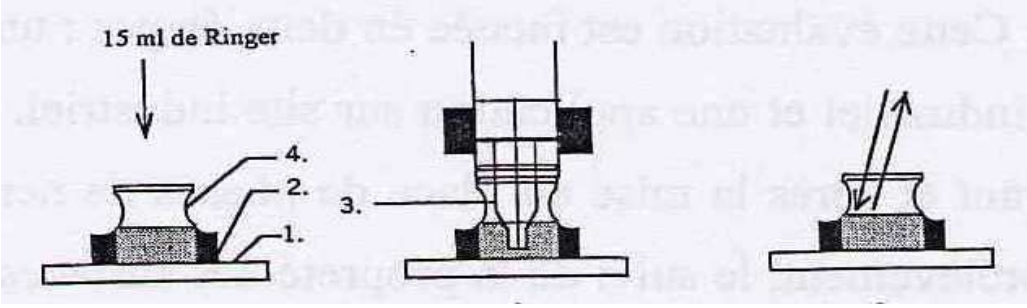
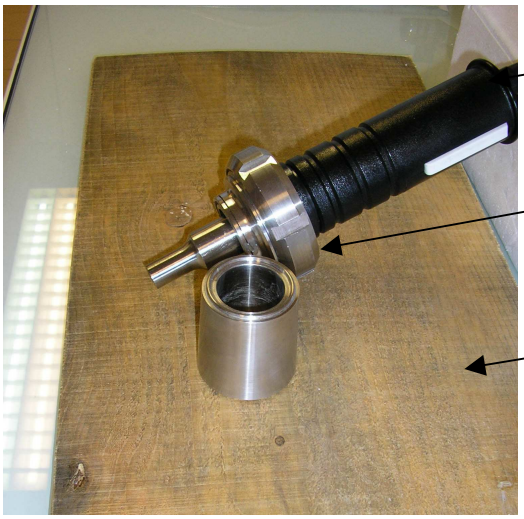


Schéma du mode opératoire du prélèvement par les ultrasons.



Equipement nécessaire pour le prélèvement par ultrasons

2. Brossage

Principe

Une surface de 10 cm² (4 x 2,5 cm) du support bois est brossée à l'aide d'une brosse à dent de modèle standard de la marque Bioseptyl-medium et d'un diluant (Ringer) visqueux semi-solide selon un protocole rigoureux. Ceci permet de décrocher au moyen d'une action mécanique non destructive les bactéries disponibles « fixées » sur la surface.

Une récupération des bactéries complémentaires au brossage se fait au moyen de carrés d'environ 3 cm x 3 cm découpés dans des chiffonnettes de marque Super Twill bleues.

Mode opératoire

• Désinfection des brosses à dent : les tremper dans une solution bactéricide de type IDOS DN (Eurochimic) à 0,5% pendant 5 min puis les rincer et les sécher à l'étuve. Les autoclaver ensuite à 110°C pendant 15 min, emballées individuellement dans du papier aluminium.

• Stérilisation des chiffonnettes : autoclavage des carrés de chiffonnettes à 121°C pendant 15 min, une dizaine de chiffonnettes par sac de papier d'aluminium.

• Préparer :
- un tube de 15ml de Ringer (Biokar), additionné de Tween 80 (MERCK- surfactant - permettant de faciliter le décollement des micro-organismes) à 2g/L et d'Agar (gélose) à 3 g/L.
- x petites bouteilles avec 30 ml de ringer.
- une boite de Pétri contenant du ringer.

• Sur la planche, délimiter une zone, sans nœud ni fente, avec les rectangles de film plastifié prédécoupés.

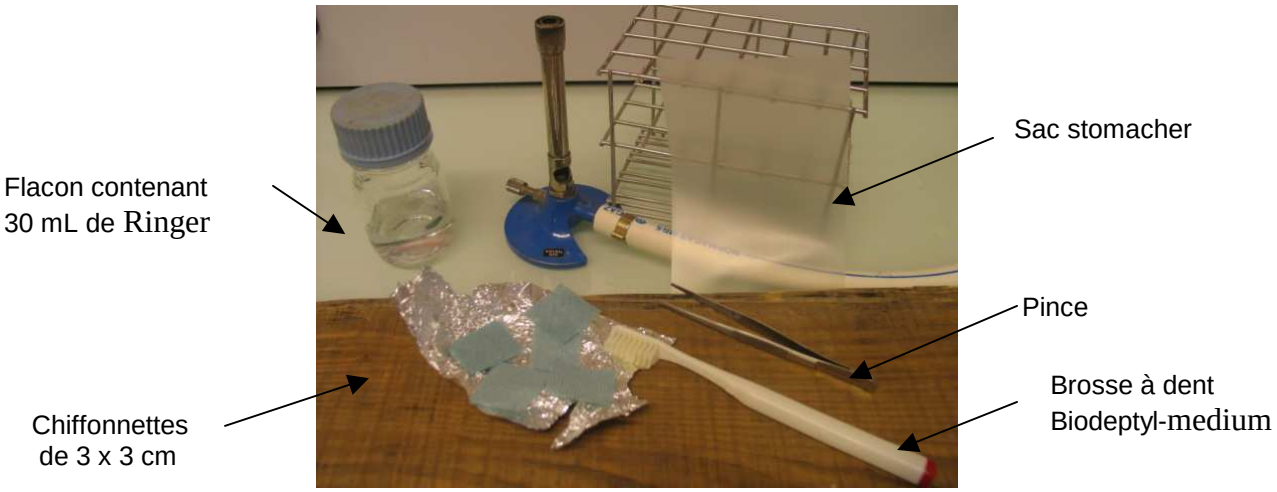
• Désinfection du film plastifié à l'aide d'un écouvillon trempé dans de l'alcool à 70°.

• Sur la zone délimitée, déposer 1 ml de ringer contenant le Tween 80 et l'agar.

• Brosser immédiatement la surface, c'est-à-dire avant que le ringer ne pénètre dans le bois, avec une brosse à dent : effectuer 10 passages horizontaux et 10 passages verticaux sur la totalité de la surface à examiner en évitant de faire des projections.

• Récupération des bactéries :
- Tremper la brosse à dent dans un sac Stomacher contenant 30ml de ringer, sans Tween 80 ni Agar. Frotter les poils de la brosse à dent avec les doigts dans le ringer à travers le sac Stomacher, puis la sortir du sac.
- Tamponner, avec une pince flambée à l'alcool, la zone délimitée à l'aide de 3 carrés de chiffonnettes stériles secs et les mettre dans le sac Stomacher.
- Tamponner une dernière fois la surface avec un quatrième carré de chiffonnette stérile humidifiée à l'aide du ringer de la boite de Pétri et le déposer dans le sac Stomacher.

• Malaxer le sac au Stomacher pendant 2 min à force maximum afin d'obtenir une suspension homogène.



Matériel nécessaire pour le prélèvement par brossage

Annexe 3 : Milieux de décrochage, de cryoconservation de dénombrement, et de croissance

1. Milieu de décrochage et de dilution : Ringer (Biokar, BR00108)

La solution de Ringer au ¼ est un diluant destiné à la préparation des solutions de dispersion pour le contrôle microbiologique des eaux, du lait, des produits laitiers et des autres produits alimentaires. Cette solution isotonique permet d'éviter les chocs osmotiques lorsque les bactéries se trouvent transférées en dehors de leur milieu habituel.

Formule :

- Chlorure de sodium	2,25 g/L
- Chlorure de potassium	0,105 g/L
- Chlorure de calcium	0,12 g/L
- Hydrogénocarbonate de sodium	0,05 g/L

2. Milieu de cryoconservation : Lait glycériné

La solution de lait glycériné est destinée à la protection des consortia microbiens issus des matrices fromagères (Chamba *et al.*, 2005). Le lait et le glycérol interviennent comme protecteurs de la membrane des microorganismes.

Formule :

- Prolait (Eurial, Sup'Rtop, par 20kg)	110g/L
- Glycérine (Merck, 4094)	15g/L

3. Milieux de dénombrement :

• Flore Mésophile Aérobie Revivifiable : Plate Count Agar (PCA) (Biokar, BK144)

La gélose glucosée à l'extrait de levure appelée par les Anglo-Saxons « Plate Count Agar »ou PCA est utilisée en bactériologie alimentaire pour le dénombrement des bactéries aérobies dans le lait, les viandes, les produits à base de viande, les autres produits alimentaires, ainsi que pour l'analyse des produits pharmaceutiques, des produits cosmétiques et de leur matières premières. Les substances nutritives apportées par le tryptone, les facteurs vitaminiques de l'extrait de levure et le glucose favorisent la croissance de la plupart des bactéries à dénombrer.

Formule :
- Tryptone 5g/L
- Extrait de levure 2,5 g/L
- Glucose 1 g/L
- Agar 12 g/L

pH : 7,0 ± 0,2

• Coliformes : Gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL) (Biokar, BK152)

La gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre est un milieu sélectif utilisé pour la recherche et le dénombrement des coliformes dans l'eau, le lait, les produits laitiers et les autres produits alimentaires. La présence simultanée de cristal violet et de sels biliaires assure l'inhibition des bactéries Gram positif. La fermentation du lactose se traduit par une acidification révélée par le virage au rouge de l'indicateur pH (rouge neutre) et par la précipitation d'acides biliaire autour des colonies.

Formule :
- Peptone pepsique de viande 7g/L
- Extrait de levure 3 g/L
- Lactose 10 g/L
- Sels biliaires 1,5 g/L
- Chlorure de sodium 5 g/L
- Rouge neutre 0,03 g/L
- Cristal violet 0,002 g/L
- Agar 12g/L

pH : 7,4 ± 0,2

• Levures et moisissures : Gélose glucosée au Chloramphénicol (CGA) (Biokar, BK007)

La gélose glucosée au chloramphénicol est destinée à la recherche et au dénombrement des levures et des moisissures dans les produits laitiers et les autres produits alimentaires. L'extrait de levure et le glucose favorisent la croissance des levures et des moisissures. La présence de chloramphénicol, antibiotique thermostable, permet d'inhiber la croissance des bactéries contaminantes.

Formule :
- Extrait de levure 5g/L
- Glucose 20g/L
- Chloramphénicol 0,1 g/L
- Agar 15 g/L

pH : 6,6 ± 0,2

• Flore Halophile : Gélose de Chapman au mannitol (Biokar, BK030)

La gélose de Chapman au mannitol permet la recherche et le dénombrement des bactéries constituant la flore halophile, principalement les staphylocoques, les microcoques et les corynébactéries. La forte concentration en chlorure de sodium inhibe la croissance de la plupart des bactéries autre que halophiles. La fermentation du mannitol, mise en évidence par le virage au jaune de l'indicateur pH (rouge de phénol) permet d'orienter le diagnostic vers des staphylocoques à coagulase positive.

Formule :

- Tryptone	5g/L
- Peptone pepsique de viande	5g/L
- Extrait de viande	1g/L
- Mannitol	10g/L
- Chlorure de sodium	75g/L
- Rouge phénol	0,025 g/L
- Agar	15g/L

pH : 7,4 ± 0,2

• *Pseudomonas* spp : GSP (Merck, 1.10230)

La gélose GSP est un milieu sélectif pour le dénombrement des *Pseudomonas* spp. Le glutamate de sodium et l'amidon soluble sont les seuls substrats nutritifs que de nombreux micro-organismes ne peuvent pas métaboliser. L'amidon est dégradé par *Aeromonas* spp avec une production d'acide, qui fait virer le rouge phénol au jaune. Les *Pseudomonas* spp ne dégradent pas l'amidon et ne présentent pas d'halo jaune. La pénicilline améliore la sélectivité.

Formule :

- Glutamate de sodium	10g/L
- Amidon soluble	20 g/L
- Dihydrogenophosphate de potassium	2 g/L
- Sulfate de magnésium	0,5 g/L
- Rouge phénol	0,36 g/L
- Agar	12g/L

+ Pénicilline G (Calbiochem, 5161), actif à 57,8 mg/L (préparation 57,8mg dans 10ml d'eau)

+ Amphotericine B (Calbiochem,171375), actif contre les levures et les moisissures à 80mg/L (préparation 1,34g dans 100ml de DMSO (Sigma, D 5879))

• Entérocoques : Gélose à la bile, à l'esculine et à l'azide de sodium (BEA) (Biokar, BK158)

La gélose à la bile, à l'esculine et à l'azide de sodium est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement et le dénombrement des entérocoques dans les eaux. L'azide de sodium provoque l'inhibition des bactéries contaminantes Gram négatif. La bile de bœuf empêche la croissance

des bactéries Gram positif, sauf des entérocoques. Les entérocoques hydrolysent l'esculine en glucose et en esculétine, qui une fois produite, forme un complexe noir en présence des ions ferriques apportés par le citrate de fer.

Formule :

Tryptone	17 g/L
Peptone pepsique de viande	3 g/L
Extrait de levure	5 g/L
Bile de bœuf	10 g/L
Chlorure de sodium	5 g/L
Esculine	1 g/L
Citrate ferrique ammoniacal	0,5 g/L
Azide de sodium	0,15 g/L
Agar	13 g/L

pH : 7,1 ± 0,2

• Bactéries lactiques : Milieu MRS (Biokar, BK089)

La gélose MRS (de Man, Rogosa et Sharpe) est utilisé pour la culture et le dénombrement des bactéries lactiques (principalement lactobacilles) dans les produits laitiers et autres produits alimentaires. Les diverses peptones, le glucose et les sels de manganèse et de magnésium apportent les éléments nutritifs indispensables à la croissance des bactéries lactiques. Le Tween 80, mélange d'esters oléiques, est une source d'acides gras nécessaires à la croissance de ces germes. Le phosphate dipotassique contribue à stabiliser le pH au cours de la croissance bactérienne. Le citrate d'ammonium et l'acétate de sodium constituent les substances inhibitrices du développement de la plupart des contaminants tels que les moisissures.

Formule :

- Polypeptone	10 g/L
- Extrait de viande	10 g/L
- Extrait autolytique de levure	5 g/L
- Glucose	20 g/L
- Tween 80	1,08 g/L
- Phosphate dipotassique	2 g/L
- Acétate de sodium	5 g/L
- Citrate d'ammonium	2 g/L
- Sulfate de magnésium	0,2 g/L
- Sulfate de manganèse	0,05 g/L
- Agar	15 g/L

pH : 6,4 ± 0,2

• Staphylocoques à coagulase positive : Baird Parker (Biokar BK 055 et BS038)

La gélose de Baird-Parker avec plasma de lapin et fibrinogène est un milieu sélectif pour la recherche et le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive dans les prélèvements

biologiques, les produits pharmaceutiques et les produits alimentaires. La croissance des staphylocoques est favorisé par le pyruvate de sodium et la glycine. La microflore secondaire est inhibée en présence de chlorure de lithium, de tellurite de potassium ainsi que par la forte concentration en glycine. Le plasma de lapin a été choisi pour son excellente spécificité vis à vis de la coagulase staphylococcique et son aptitude à produire rapidement un coagulum, renforcé par le fibrinogène bovin, ce qui se traduit par l'apparition de fibrine autour des colonies. La coloration noire des colonies de *Staphylococcus aureus* est due à la réduction du tellurite de potassium en tellure

Formule :

-Tryptone	10 g/L
- Extrait autolytique de levure	1 g/L
- Extrait de viande	5 g/L
- Pyruvate de sodium	10 g/L
- Glycine	12 g/L
- Chlorure de lithium	5 g/L
- Plasma de lapin, EDTA	25 mL/L
- Fibrinogène bovin	5 g/L
- Inhibiteur de trypsine	25 mg/L
- Tellurite de potassium	25 mg/L
- Agar	15 g/L

pH : 7,2 ± 0,2

• *Listeria* spp : Palcam (Merck, 1.11755 et 1.12122)

La gélose Palcam est un milieu sélectif utilisé pour le dénombrement et l'isolement des *Listeria* spp dans les prélèvements pathologiques, les produits alimentaires ainsi que les autres prélèvements contaminés. Les peptones et l'extrait de levure favorisent une excellente croissance des *Listeria*. Le glucose et l'amidon représentent les sources énergétiques du développement. Le chlorure de sodium maintient l'équilibre osmotique. Les *Listeria* hydrolysent l'esculine en glucose et esculétine. L'esculétine produite forme un complexe noir en présence des ions ferriques apportés par le citrate de fer. La microflore secondaire est inhibée par l'association entre le chlorure de lithium, la ceftazidime, la polymixine et l'acriflavine. La fermentation du mannitol par les germes contaminants qui pourraient se développer est mise en évidence par le virage au jaune du rouge phénol, permettant ainsi d'orienter le diagnostic.

Formule :

- Peptone	23 g/L
- Extrait autolytique de levure	3 g/L
- Glucose	0,5 g/L
- Amidon	1 g/L
- D-mannitol	10 g/L
- Esculine	0,8 g/L
- Citrate de fer III ammoniacal	0,5 g/L
- Chlorure de lithium	15 g/L

- Chlorure de sodium	5 g/L
- Phosphate disodique anhydre	9,6 g/L
- Phosphate monopotassique	1,35 g/L
- Polymixine B	10 mg/L
- Ceftazidime	20 mg/L
- Acriflavine	5mg/L
- Rouge phénol	0,08 g/L
- Agar	10 g/L

pH : 7,2 ± 0,2

• Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs FH (Isolini, 1990)

La gélose FH est un milieu sélectif utilisé pour le dénombrement et l'isolement des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs mésophiles dans le lait et les produits laitiers. Dans ce groupe, on retrouve entre autres : *L. paracasei* subsp.(L), *L. rhamnosus* (L), *L. plantarum* (DL), *L. curvatus* (DL).

Milieu de base

- Peptone (Difco, 211677)	10g
- Extrait de viande (Biokar, A1710HA)	10g
- Extrait de levure (Difco, 212750)	1g
- Mannitol (Merck, 1.05982)	20g
- Sulfate de magnésium, 7H2O (Merck, 5886.0500)	0,11g
- Sulfate de manganèse, 1H2O (Prolabo, 25303.233)	0,2g
- Tween 80 (Merck, 8.22187.0500)	1ml
- Tampon acétate 1M, pH 5,4	200ml
- Agar bactériologique (Biokar, A1012HA)	15g
- Eau distillée	800 ml

+ Vancomycine (Sigma, V2002), sélection des lactobacilles à 50 mg/L (préparation 100mg dans 2 ml d'eau)

• Leuconostocs : Milieu Nickels et Leesment (FIL 180 :1997):

La gélose NL est un milieu sélectif utilisé pour le dénombrement et l'isolement des leuconostocs dans le lait et les produits laitiers. Les leuconostocs sont des bactéries lactiques mésophiles fermentant le citrate.

Milieu de base :

- Extrait de levure (Difco, 212750)	5 g/L
- Tryptone (Difco, 211705)	20 g/L
- Gélatine (Merck, 1.04070)	5 g/L

- Glucose (Merck, 1.08342)	5 g/L
- Lactose (Merck, 1.07657)	5 g/L
- Chlorure de sodium (Cooper, PR027810295)	4 g/L
- Citrate de sodium dihydraté (Merck, A385148310)	2 g/L
- Agar bactériologique (Biokar, A1012HA)	15 g/L
- Lactate de calcium pentahydraté (Sigma, C-8356)	6,95 g/L
- Citrate de calcium tétrahydraté (Merck, 1.02092)	5,8 g/L
- Carboxymethylcellulose (Sigma, C5678)	2,6 g/L
- Sérum de levain	

+ Vancomycine (Sigma, V2002), sélection des leuconostocs à 170 mg/L (préparation 100mg dans 2 ml d'eau)
+ Amphotericine B (Calbiochem, 171375), actif contre les levures et les moisissures à 80mg/L (préparation 1,34g dans 100ml de DMSO (Sigma, D 5879))

• Microcoques et corynébactéries : (MCM) (ITFF-Aérial)

La gélose MCM est un milieu sélectif pour les dénombrements des microcoques et des bactéries corynéformes issues des surfaces de fromages. Le lactate de sodium et le glucose sont des sources de carbone et la tryptone et l'extrait de levure des sources de matière azotée. La sélectivité de ce milieu est basée sur une forte concentration en sel ainsi que l'ajout d'antibiotiques.

Milieu de base :

- Tryptone (Difco,211705)	15 g/L
- Peptone de soja (Difco, 243620)	5 g/L
- Extrait de levure (Difco, 212750)	6 g/L
- Lactate de sodium 60% (Merck, K31 625422.334)	20ml/L
- Phosphate dipotassique (Merck, 1.05099.1000)	2,5 g/L
- Chlorure de sodium (Cooper, PR027810295)	40 g/L
- Agar bactériologique (Biokar, A1012HA)	15 g/L

+ Amphotericine B (Calbiochem,171375), actif contre les levures et les moisissures à 80mg/L (préparation 1,34g dans 100ml de DMSO (Sigma, D 5879))

+ Acide nalidixique (Sigma, N4382), actif contre les bactéries gram négatives et *Bacillus* spp à 40mg/L (préparation 1g dans 100ml d'eau)

+ Furazolidone (Sigma, F9505), actif contre les stapyhylocoques spp à 10mg/L (préparation 10mg dans 30ml d'acétone)

• Staphylocoques spp : CRBM (Denis *et al*., 2001)

La gélose CRBM est un milieu sélectif pour les dénombrements des flores de surface d'affinage des fromages. Le lactate de sodium et le glucose sont des sources de carbone et la tryptone et l'extrait de levure des sources de matière azotée. La sélectivité de ce milieu est basée sur une forte concentration en sel. La sélection des staphylocoques spp est réalisée avec l'ajout des antibiotiques.

Milieu de base CRBM :

- Phosphate dipotassique (Merck, 1.05099.1000)	5 g/L
- Lactate de sodium 60% (Merck, K31 625422.334)	33,4 g/L
- Sulfate de magnesium, 7 H2O (Merck, 5886.0500)	2 g/L
- Tryptone (Difco, 211705)	10 g/L
- Extrait de levure (Difco, 212750)	7 g/L
- Chlorure de sodium (Cooper, PR027810295)	50 g/L
- Tween 80 (Merck, 8.22187.0500)	1 g/L
- Agar bactériologique (Biokar, A1012HA)	15 g/L

+ Amphotéricine B (Calbiochem,171375), actif contre les levures et les moisissures à 80mg/L (préparation 1,34g dans 100ml de DMSO (Sigma, D 5879))

+ Acide nalidixique (Sigma, N4382), actif contre les bactéries gram négatives et *Bacillus* spp à 40mg/L (préparation 1g dans 100ml d'eau)

+ Bacitracine (Sigma, B 0125), actif contre les microcoques à 30mg/L (préparation 50mg dans 1ml d'eau)

• Flore acidifiante mésophile : Mesophile Elliker

La gélose Elliker est un milieu de dénombrement favorable à la croissance de toutes les bactéries lactiques. La température de croissance de 15°C sélectionne les bactéries mésophiles.

<u>Milieu de base</u>

- 20 g de tryptone (Difco),
- 5 g d'extrait de levure (Difco), ,
- 2,5 g de gélatine (Merck),
- 4 g de chlorure de sodium (Cooper),
- 1.5 g d'acétate de sodium anhydre (Humeau, 18002765347),
- 0.5 g d'acide ascorbique (Fischer, 0202F),
- 10 g de lactose (Merck),
- 0.5 g de glucose (Merck),

- 5 g de glycérophosphate de sodium (Humeau, 1450041647),
- 15 g d'agar bactériologique (Biokar)
pH : 6,8 ± 0,2

5. Milieu de culture et d'enrichissement des *Listeria*

• Trypcase Soja Bouillon (Biomerieux, 51019)

Le bouillon Trypcase Soja constitue un milieu d'utilisation générale pour un grand nombre de micro-organismes ne présentant pas d'exigences particulières. Le mélange de trypcase de soja et de glucose contribue à la croissance des micro-organismes. Le chlorure de sodium est destiné au maintien de la pression osmotique.

Formule :

- Biotrypcase 17g/L
- Biosoyase 3 g/L
- Chlorure de sodium 5 g/L
- Phosphate bipotassique 2,5 g/L
- Glucose 2,5 g/L

• Bouillon de Fraser et de Fraser-demi (BK 133, avec suppléments sélectifs BS 031 et BS032)

Les bouillons de Fraser et de Fraser-demi sont utilisés pour l'enrichissement sélectifs et différentiel de *Listeria monocytogenes* dans les produits alimentaires ainsi que les autres prélèvements susceptibles d'en contenir.
La seule différence de concentration en acide nalidixique et en acriflavine des bouillons de Fraser-demi et de Fraser ainsi que les 2 étapes d'enrichissement permettent une récupération très satisfaisante de *L. monocytogenes*. Le bouillon de Fraser-demi permet de réaliser l'étape d'enrichissement primaire, alors que l'étape d'enrichissement secondaire s'effectue avec le bouillon de Fraser.
La polypeptone, l'extrait de levure et l'extrait de viande apportent les éléments nutritifs nécessaires à la croissance des *Listeria*. La forte teneur en chlorure de sodium permet d'accroître la sélectivité du milieu. Les phosphates agissent comme substances tampons pour le maintien du pH. L'esculine est hydrolysée par les *Listeria* en glucose et en esculétine. Ce dernier composé forme un complexe noir en présence des ions ferriques apportés extemporanément par le citrate de fer qui favorise également la croissance des *Listeria.* Le chlorure de lithium inhibe la plupart des entérocoques susceptibles d'hydrolyser l'esculine. L'acide nalidixique bloque la réplication de l'ADN des micro-organismes sensibles à cet agent antibactérien. L'acriflavine supprime la croissance de la microflore secondaire Gram positive.

Formule :

- Polypeptone	10 g/L
- Extrait autolytique de levure	5 g/L
- Extrait de viande	5 g/L
- Chlorure de sodium	20 g/L
- Phosphate disodique anhydre	9,6 g/L
- Phosphate monopotassique	1,35 g/L
- Esculine	1g/L
- Chlorure de lithium	3 g/L
- Citrate de fer III ammoniacal	0,5 g/L
- Acide nalidixique	20 mg/L (Fraser)
	10 mg/L (Fraser-demi)
- Acriflavine	25mg/L(Fraser)
	12,5 mg/L (Fraser-demi)

Annexe 4 : Mesures des paramètres physico-chimiques des planches

1. Mesure de la teneur en eau avec l'humidimètre type DS4A-DOMA (Scangaule, Gravigny, France)

L'humidimètre électronique DS4A-DOMA est utilisé pour déterminer en quelques secondes la teneur des matériaux. Le taux d'humidité moyen est mesuré jusqu'à une profondeur de 3 cm environ.

Fonctionnement

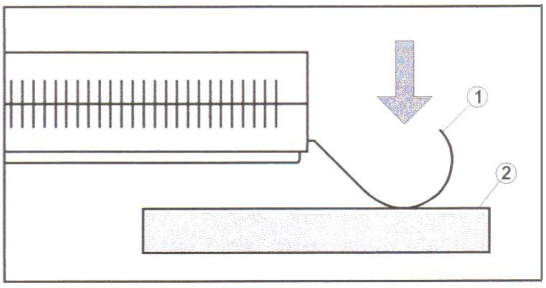
Pendant la mesure, les électrodes de mesure de l'appareil sont posées sur le bois. Un champ électrique de haute fréquence traverse alors le matériau. Un micro processeur reçoit les signaux de mesure et détermine alors la teneur en eau en pourcentage.

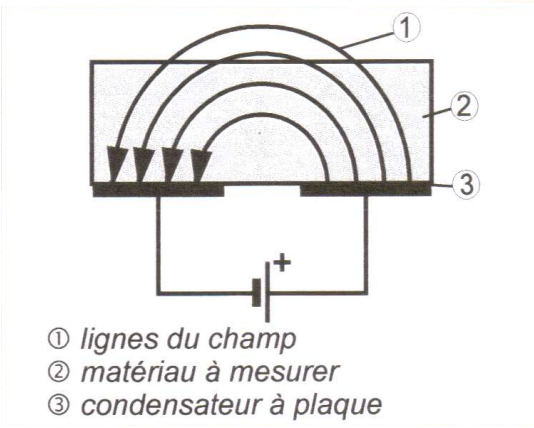
Principe de mesure

L'appareil fonctionne selon le principe d'un condensateur à plaque ouverte. La capacité du condensateur dépend de la constante diélectrique du matériau entre les plaques. Comparé à l'air (ε~1), l'eau a une constante diélectrique élevée (ε~80). La teneur en eau du matériau peut donc être déterminée en mesurant sa constante diélectrique.

Mode opératoire

- Placer 2 planches l'une sur l'autre en évitant les poches d'air pour obtenir une épaisseur supérieure à 2 cm.
- Retenir une surface plane et lisse de minimum 10 cm sur 10 cm. La distance minimale des électrodes du bord de la surface doit être de 1cm.
- Sélectionner le bois épicéa
- Poser l'humidimètre sur le matériau, la valeur de pourcentage de teneur en eau s'affiche.





1. Electrodes de l'humidimètre
2. Planche

Schéma du mode opératoire et du principe de la mesure

2. Mesure de l'a_w avec l'appareil FA-st/1 (GBX Scientific Instruments, Romans sur Isère, France)

L'activité de l'eau ou a_w constitue une mesure de la plus ou moins grande disponibilité de l'eau dans les produits agro-alimentaire, chimiques, cosmétiques ou les végétaux. L'a_w est déterminée par le rapport de la pression de vapeur d'eau au-dessus de tout échantillon par la pression de vapeur d'eau de l'eau pure à la même température.

$a_w = P_w/P^0w$

avec

P_w= Pression partielle de vapeur d'eau d'une solution ou d'un aliment

P^0w= Pression partielle d'eau pure à la même température

En enceinte close, il y a égalité entre activité du produit et pression partielle de vapeur exercée par le produit.

a_w = Humidité relative à l'équilibre (%) / 100

Principe de la mesure

La mesure de l'a_w est basée sur le principe de l'hygromètre à miroir, par mesure de l'humidité relative à l'équilibre dans un système étanche par la mesure du point de rosée.
Lors de la mesure de l'a_w, l'humidité de la planche et de la chambre de mesure déposée dessus s'équilibrent. Le miroir de la tête de mesure est chauffé et refroidi par un effet Peltier (thermocouple) jusqu'à la formation de buée à la surface de ce miroir. Le capteur optique, situé au dessus du miroir, mesure la température du miroir. Cette température est en fait égale à la température de rosée et est en relation directe avec la pression de vapeur saturante dans la chambre de mesure. La température de rosée étant par définition la température à laquelle il faut refroidir un gaz pour voir son eau se condenser. Un thermomètre infra-rouge mesure d'autre part la température de surface de l'échantillon en relation direct avec la pression de vapeur saturante de l'eau à cette même température.

Mode opératoire

- Réguler la température de la tête de mesure à 15°C
- Choisir une surface plane, sans noeud ni fente
- Déporter la chambre de mesure sur la zone choisie, avec un poids de 150g
- Lancer la mesure en mode cinétique
- Après une durée réservée à la mise en équilibre de l'enceinte et de la planche, l'appareil donne régulièrement des valeurs d'a_w.
- Lorsque la différence entre 2 valeurs est inférieure au seuil de précision (0,005), noter les 3 valeurs suivantes.

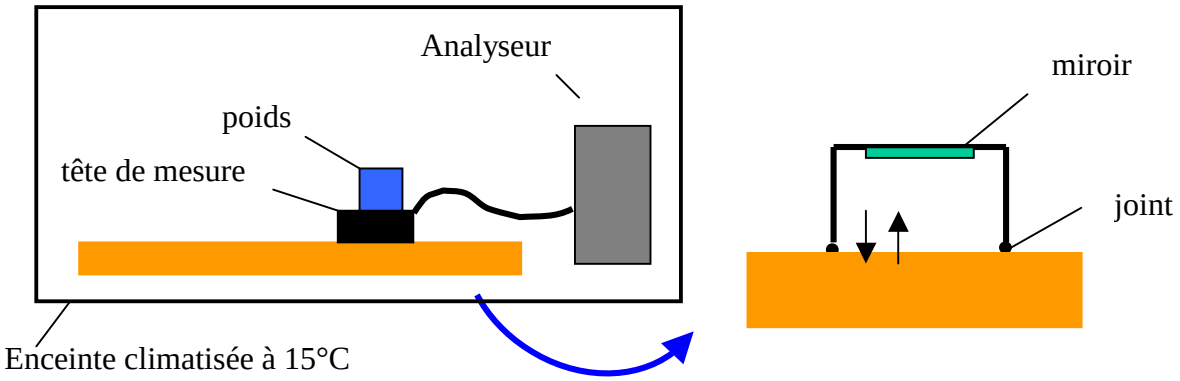


Schéma de l'appareillage

3. Mesure de la teneur en sel avec le chloruremètre CORNING 926

Principe

Le chloruremètre CORNING 926 comprend :

- Un circuit de génération composé de 2 électrodes qui crée un courant électrique constant entraînant une production constante d'ions d'argent Ag^+ .
- Un circuit de détection constitué d'une électrode indicatrice en argent et d'une électrode de référence qui permet de déterminer par potentiométrie la quantité d'ions chlorures Cl^- dans la solution à analyser.

Les ions d'argent Ag^+ créés par le courant électrique se combinent avec les ions chlorures Cl^- de la solution à analyser pour donner un précipité de chlorure d'argent AgCl suivant l'équation de réaction $Ag^+ + Cl^-$ ### AgCl.

Quand tous les ions chlorures Cl^- sont combinés avec les ions d'argent Ag^+, les ions d'argent Ag^+ libres réapparaissent, la conductivité de la solution charge et est détectée. La teneur ions chlorures Cl^- en mg/L s'affiche.

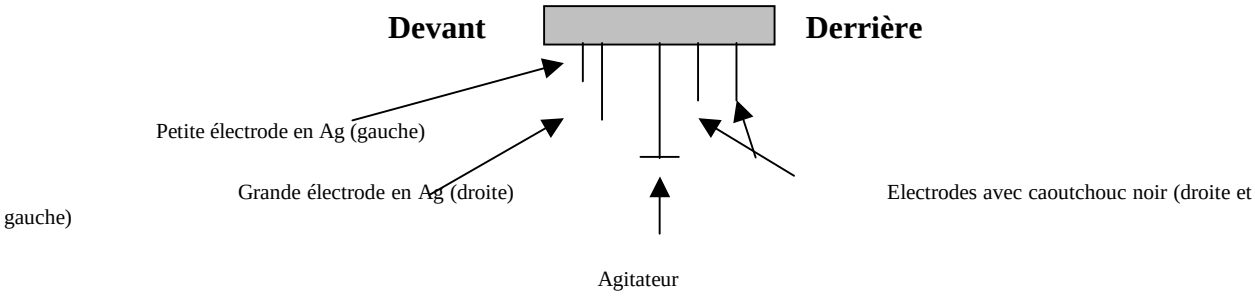


Schéma du Corning 926

Mode opératoire

- Choisir une zone sans fente ni nœud
- Poncer une surface de 27,5 cm² sur environ 1 mm à l'aide d'une ponceuse électrique
- Mélanger un gramme de sciure avec 50 ml d'eau distillée avec un ultraturax
- Laisser décanter le mélange 1 heure à température ambiante
- Prélever 0.5 ml de la solution échantillon (à environ 2 mm de la surface et au même endroit) à analyser.

- Injecter ce prélèvement dans le bécher contenant la solution tampon acide combiné (CIBA-CORNING).
- Appuyer sur "TITRATE". L'appareil s'arrête automatiquement.
- Lire le résultat affiché (en mg/l) On réalisera au moins 2 mesures sur le même échantillon. Les valeurs obtenues ne doivent pas différer de plus de 2 unités (sinon recommencer).
- On fera alors la moyenne des 2 valeurs.
- La teneur en Chlorures exprimée en g/100g est égale à:

$\mathbf{0.005 \times (58.44 / 35.45) \times (C / m)}$ ou $0.00824 \times (C / m)$

où **C** est la valeur affichée par le chloruremètre (en mg/l)

m est la masse en g de la prise d'essai.

Annexe 5 : Norme NF V01 009 2006 : Hygiène et sécurité des produits alimentaires. Lignes directrices pour la réalisation des tests de croissance microbiologique.

Annexe A Caractérisation de la variabilité inter-lots des paramètres physico-chimiques et impact sur la croissance microbienne

- Calculer : $\varphi_{\mathrm{T}} = \left(\dfrac{T_{\mathrm{opt}} - T}{T_{\mathrm{opt}} - T_{\mathrm{min}}} \right)^3$

où T (°C) est la température utilisée lors du test de croissance, T_{min} (°C) et T_{opt} (°C) sont respectivement les températures minimale et optimale de croissance du micro-organisme étudié.

- Calculer : $\varphi_{\mathrm{pH,i}} = \left(\dfrac{pH_{\mathrm{opt}} - \overline{pH} - 2s_{\mathrm{pH}}}{pH_{\mathrm{opt}} - pH_{\mathrm{min}}} \right)^3$ et $\varphi_{\mathrm{pH,s}} = \left(\dfrac{pH_{\mathrm{opt}} - \overline{pH} + 2s_{\mathrm{pH}}}{pH_{\mathrm{opt}} - pH_{\mathrm{min}}} \right)^3$

où $\overline{pH}$ est le pH moyen inter-lots de l'aliment, s_{pH} est l'écart-type inter-lots du pH de l'aliment, pH_{min} et pH_{opt} sont respectivement les pH minimal et optimal de croissance du micro-organisme étudié.

- Calculer : $\varphi_{\mathrm{a_w,i}} = \left(\dfrac{a_{\mathrm{wopt}} - \overline{a_{\mathrm{w}}} - 2s_{\mathrm{a_w}}}{a_{\mathrm{wopt}} - a_{\mathrm{wmin}}} \right)^3$ et $\varphi_{\mathrm{a_w,s}} = \left(\dfrac{a_{\mathrm{wopt}} - \overline{a_{\mathrm{w}}} + 2s_{\mathrm{a_w}}}{a_{\mathrm{wopt}} - a_{\mathrm{wmin}}} \right)^3$

où $\overline{a_{\mathrm{w}}}$ est l'a_{w} moyenne inter-lots de l'aliment, $s_{\mathrm{a_w}}$ est l'écart-type inter-lots de l'a_{w} de l'aliment, a_{wmin} et a_{wopt} sont respectivement les a_{w} minimale et optimale de croissance du micro-organisme étudié.

- Calculer les deux paramètres :

$$\psi_{\mathrm{i}} = \frac{\varphi_{\mathrm{T}}}{2(1-\varphi_{\mathrm{pH,i}})(1-\varphi_{\mathrm{a_w,i}})} + \frac{\varphi_{\mathrm{pH,i}}}{2(1-\varphi_{\mathrm{T}})(1-\varphi_{\mathrm{a_w,i}})} + \frac{\varphi_{\mathrm{a_w,i}}}{2(1-\varphi_{\mathrm{T}})(1-\varphi_{\mathrm{pH,i}})}$$

et

$$\psi_s = \frac{\varphi_T}{2(1-\varphi_{pH,s})(1-\varphi_{a_w,s})} + \frac{\varphi_{pH,s}}{2(1-\varphi_T)(1-\varphi_{a_w,s})} + \frac{\varphi_{a_w,s}}{2(1-\varphi_T)(1-\varphi_{pH,s})}$$

- Puis calculer : $\Delta\psi = \psi_s - \psi_i$

La variabilité inter-lots des paramètres physico-chimiques de l'aliment a un impact significatif sur la croissance du micro-organisme étudié si $\psi_i \cdot \Delta\psi$ et $\psi_s \cdot \Delta\psi$ sont tous les deux supérieurs à 0,1.

<u>Exemple</u> :

Micro-organisme étudié : *Listeria monocytogenes*.

Températures cardinales : T_{min} = -1,72°C, T_{opt} = 37°C.

pH cardinaux : pH_{min} = 4,71, pH_{opt}=7.

a_w cardinales : a_{wmin} = 0,913, a_{wopt} = 0,997.

pH inter-lots de l'aliment : $\overline{pH}$ = 6,5 et s_{pH} = 0,1.

a_w inter-lots de l'aliment : $\overline{a_w}$ = 0,96 et s_{a_w} = 0,005.

Si la température de réalisation du test de croissance est de 8°C, on obtient :

$\varphi_T = 0,42$, $\varphi_{pH,i} = 0,01$, $\varphi_{pH,s} = 0,03$, $\varphi_{a_w,i} = 0,03$, $\varphi_{a_w,s} = 0,18$, $\psi_i = 0,25$, $\psi_s = 0,45$ et $\Delta\psi = 0,20$.

Donc $\psi_i \cdot \Delta\psi = 0,05$ et $\psi_s \cdot \Delta\psi = 0,09$: l'impact de la variabilité inter-lots des paramètres physico-chimiques sur le comportement de *L. monocytogenes* peut être considéré comme négligeable et un seul lot pourra être étudié lors du test de croissance.

Si la température de réalisation du test de croissance est de 4°C, on obtient :

$\varphi_T = 0,62$, $\varphi_{pH,i} = 0,01$, $\varphi_{pH,s} = 0,03$, $\varphi_{a_w,i} = 0,03$, $\varphi_{a_w,s} = 0,18$, $\psi_i = 0,37$, $\psi_s = 0,67$ et $\Delta\psi = 0,30$.

Donc $\psi_i \cdot \Delta\psi = 0,11$ et $\psi_s \cdot \Delta\psi = 0,20$: l'impact de la variabilité inter-lots des paramètres physico-chimiques sur le comportement de *L. monocytogenes* n'est pas négligeable et au moins trois lots devront être étudiés lors du test de croissance pour pouvoir conclure sur un type de comportement (absence de croissance, croissance) de *L. monocytogenes* dans cet aliment.

Annexe 6 : Compte-rendu des travaux réalisés à l'UMR INRA/ENSIA Bio-adhésion et hygiène des matériaux pour le programme ACTIA n°03-27

Synthèse des travaux sur l'influence d'un consortium microbien des planches d'affinage du reblochon sur *Listeria monocytogenes*

D'après le modèle d'Augustin et al. (2005), les conditions physico-chimiques des planches d'affinage de reblochon ne peuvent pas inhiber la croissance de L. monocytogenes. Cependant, les résultats des partenaires du projet ont montré qu'il n'y avait pas de développement de sur les planches d'affinage. Cette inhibition s'expliquant notamment par la présence d'un biofilm vivant à la surface de ces planches

Deux causes sont mises en avant :

- Une compétition nutritionnelle entre une ou plusieurs espèces constituant le biofilm,
- La production par le biofilm d'inhibiteurs de croissance de L. monocytogenes.

Les essais proposés avaient pour objectif permettre de comprendre et mettre en évidence la nature de « l'effet négatif » de consortiums microbiens sur l'implantation ou la croissance de Listeria monocytogenes sur la surface de planches d'affinage de reblochon.

Une étude similaire a été menée en parallèle sur un consortium microbien de planche d'affinage de Munster (Guillier et al., 2006).

1. Matériel et méthodes

a. Préparation et origines des souches

- *L. monocytogenes* (Souches AER102 et SIR)

  - Étape 1 : pré-cultures

J0 : décongélation d'un cryotube à -80°C et ensemencement d'un tube de 9 ml de TSBye à 15°C pendant 24h (Tube 1)

J1 (J0+24 h) : 1 dilution au 1/100ème du tube 1 dans TSBye à 15°C (tube 2). Incubation 72 h à 15°C

J4 (J1+72 h) : on dispose d'une culture en phase stationnaire à environ 9.3 $\log_{10}$ ufc / ml.

  - Étape 2 : Ensemencement des filtres

J4 : à partir du tube 2, on réalise plusieurs dilutions successives (1/100ème) en eau afin d'obtenir une suspension contenant 5.10^4 ou 5.10^6 ufc/ml. 0,1 ml ou 0,05 ml de ces solutions ont été déposés sur les filtres pré-imbibés par 0,2 ml de bouillon REVIV.

- Consortium Reblochon :

J0 : Décongélation d'un cryotube à -80°C.

Après décongélation on dispose de ~5.10^7 ufc/ml.

Dilution de façon à obtenir ~5.10^5 ufc/ml de Bouillon de Revivification.

b. Préparation des fromages et des filtres

- **Fromage :**

Le substrat de croissance est un fromage de type fromage à pâte molle et croûte lavée. Des fromages de 11 cm de diamètre au stade après levurage (« blancs à fromage » + 4-5 jours) ont été choisis. Les caractéristiques physico-chimiques et les dénombrements en levure de ces fromages sont reportées sur le Tableau 1.

Les fromages ont été conditionnés dans un sachet sous-vide. Ils ont été ensuite été ionisés (protocole Aérial). Stériles, ils ont été conservés jusqu'à leur utilisation à une température de –18°C.

Avant leur utilisation, les fromages étaient décongelés à température ambiante pendant 2 à 3 heures dans leur emballage stérile. Ensuite les fromages étaient découpés en deux demi-fromages (ou fromages ayant une épaisseur réduite de moitié). La surface externe des fromages était la surface utile pour déposer les filtres.

- Filtres :

Des filtres en fibre de verre, GFF (VWR France) de 24 mm de diamètre ont été choisis comme support de croissance pour les cultures microbiennes sur les fromages ionisées. Trémoulet et al. (2002) ont utilisé ce type de fibre pour l'étude des propriétés de *L. monocytogenes* se développant en culture immobilisée.

Les filtres ont été autoclavés et déposés sur la surface des fromages à l'aide d'une pince stérile. Ils ont ensuite été imbibés d'une solution de bouillon REVIV (0,2 ml).

Tableau 1 : Caractéristiques des fromages à pâte molle et croûte lavée avant ionisation (d'après programme AQS temps de latence – *Listeria*)

Essai n°	pH	a_w	Levures log_{10}(ufc/g)
1	6.7	0.971	Non déterminé
2	6.9	0.968	Non déterminé
3	7.0	0.964	9.5
4	6.7	0.972	9.5

Le dispositif fromage + filtre se présente comme présenté sur la Figure 1.

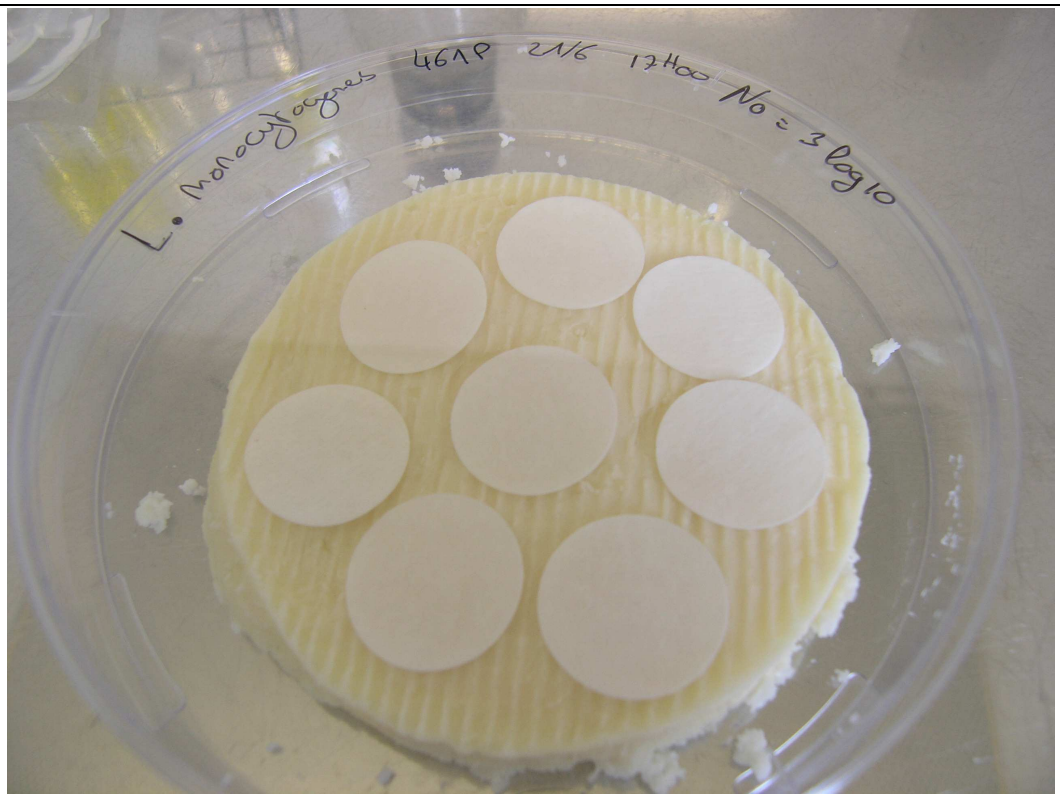


Figure 1. Fromage à pâte molle et croûte lavée ionisé et filtres en fibre de verre déposés à sa surface.

c. Monocultures et co-cultures sur filtres

En plus de monocultures des deux souches de *L. monocytogenes* et du consortium reblochon, des co-cultures ont été réalisées. Pour ces co-cultures, le plan d'expérience était le suivant :

- facteur 1 : deux souches de *L. monocytognes* (SIR et AER102)
- facteur 2 : deux niveaux d'inoculum de *L. monocytognes* (3 et 5 $\log_{10}$(ufc/filtre))
- facteur 3 : deux temps d'implantation (9 et 9 $\log_{10}$(ufc/filtre) et 2 jours de phase stationnaire pour le CR).

Chaque niveau de ce plan d'expérience a été répété trois fois (=trois expérimentations indépendantes). La répartition des dénombrements pour chaque cinétique s'est réalisée en fonction des résultats des premiers dénombrements. Les cinétiques de croissance comportent entre 8 à 12 points.

d. Température et hygrométrie

Les fromages pour l'étude de la croissance de *L. monocytogenes* en mono ou co-culture ont été placés dans une enceinte climatique à 15°C et 98% d'humidité relative (HR). Ce choix s'explique par

les conditions d'affinage industrielles des fromages à pâte molle et croûte lavée où les valeurs sont proches des conditions de notre étude.

e. Dénombrements

Les filtres ont été récupérés stérilement et placés dans des sacs stomacher contenant 10 ml de bouillon REVIV. Le sacs ont été stomachés pendant 5 minutes.

Deux types de milieux ont été employés :

- Le milieu Palcam pour le dénombrement de *L. monocytogenes*. Les boites ont été ensemencées en surface avec les dilutions suivies avec des volumes allant de 0,05 ml à 2 ml. La lecture des boites et le comptage des colonies caractéristiques s'effectuaient de 48h à 72h après incubation à 37°C.
- Le milieu TSBye pour la flore totale. Les boites ont été ensemencées en surface avec les dilutions suivies avec des volumes de 0,05 ml. La lecture des colonies se déroulait de 5 à 10 jours après incubation à 20°C.

f. Détermination des paramètres de croissance

Nous avons utilisé comme modèle primaire de croissance le modèle de Baranyi et Roberts (1994). L'ajustement du modèle sur les données observées de dénombrement nous a permis de déterminer x_0 est la concentration initiale en bactérie, *lag* durée de la phase de latence, μ_{max} taux de croissance exponentielle et x_{max} la concentration maximale atteinte pendant la phase stationnaire.

L'ajustement de ce modèle primaire a uniquement été réalisé pour les monocultures. L'allure générale de la cinétique dans le cas des co-cultures ne permettait pas l 'ajustement des modèles primaires de croissance pour *L. monocytogenes*.

g. Métabolites produits sur filtres et influence sur la croissance de *L. monocytogenes*

Nous avons testé l'influence des métabolites produits par le consortium reblochon à différentes phases de la croissance sur filtres.

La récupération des métabolites des cultures de consortiums sur filtres s'est effectuée par reprise des filtres dans 10 ml de milieu TSBye avec stomachage pendant 5 min. Le milieu a ensuite été filtré sur filtre 0,45 µm (Steriflip, Millipore, France).

Le procédé de suivi de la croissance à l'aide du Bioscreen et la détermination du taux de croissance sont décrits par ailleurs.

2. Résultats

a. Monocultures

La Figure 2 représente un exemple de la croissance du consortium reblochon et des deux souches de *L. monocytogenes*. La croissance sur la matrice fromage à 15°C et 98% d'humidité relative montre un avantage des consortiums sur *L. monocytogenes* en ce qui concerne la vitesse de multiplication (Tableau 2). La différence entre les deux souches de *L. monocytogenes* ne semble pas significative.

Tableau 2. Paramètres de croissance des deux souches de *L. monocytogenes* et du Consortium Reblochon en monoculture sur filtres GFF à 15°C et 98% d'humidité relative.

Souches	Taux de croissance (h^{-1})		Temps de latence (h)		Nmax - log10(ufc/filtre)	
	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
L. monocytogenes SIR	0.101	0.017	30.3	10.9	8.1	0.4
L. monocytogenes AER102	0.106	0.011	25.5	13.1	8.1	0.1
Consortium Reblochon	0.148	0.004	31.7	5.2	9.2	0.1

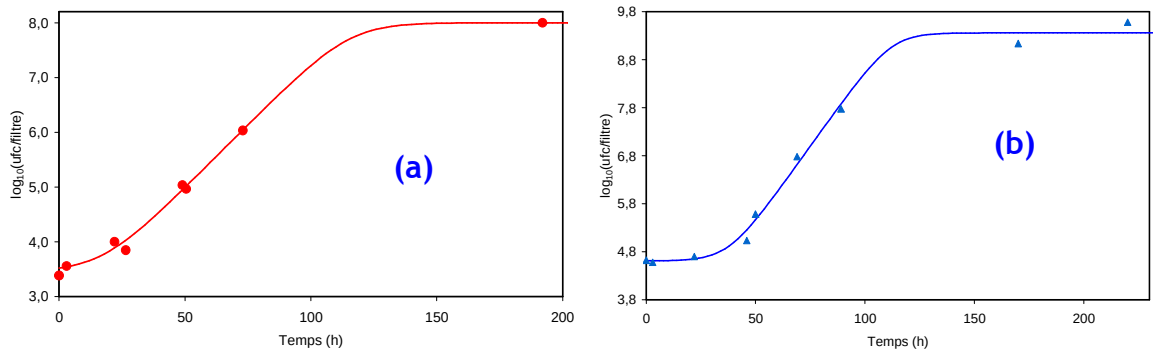


Figure 2. Exemples de cinétique de croissance en monoculture sur filtres GFF à 15°C et 98% d'humidité relative de (a) *L. monocytogenes* AER102 et (b) Consortium reblochon. (▲) et (●) données observées ; (—) modèle primaire ajusté.

b. Co-cultures

- CR-AER102

Les résultats des co-cultures sont présentés sur les Figures 3a, 3b, 3c et 3d. Contrairement au mono-culture, l'allure des cinétiques ne nous a pas permis d'ajuster le modèle primaire de croissance sur les données expérimentales. Les données de croissance de la souche de *L. monocytogenes* AER 102 en co-culture avec le consortium reblochon nous montre que le niveau maximal atteint est inférieur par rapport à la croissance en monoculture. Cet effet paraît plus marqué quand la taille d'inoculum est petite et/ou quand *L. monocytogenes* AER 102 est implantée sur un biofilm du consortium reblochon âgé.

- CR-SIR

Les résultats des co-cultures sont présentés sur les Figures 4a, 4b, 4c et 4d. De la même façon que pour la souche AER102 l'allure des points ne permettait pas un ajustement correct des cinétiques de croissance de *L. monocytogenes* SIR. Pour cette souche, l'effet du consortium reblochon sur le niveau maximal atteint est moins important. Il semble également d'autant moins marqué que la taille de l'inoculum de *L. monocytogenes* est fort.

c. Métabolites produits sur filtres

La Figure 5 illustre l'influence des composés produits sur filtres par le consortium reblochon à différentes phases de croissance du consortium reblochon sur filtres en fibre de verre. Le taux de croissance de *L. monocytogenes* en milieu de culture n'est pas significativement influencé par les composés produits par le consortium.

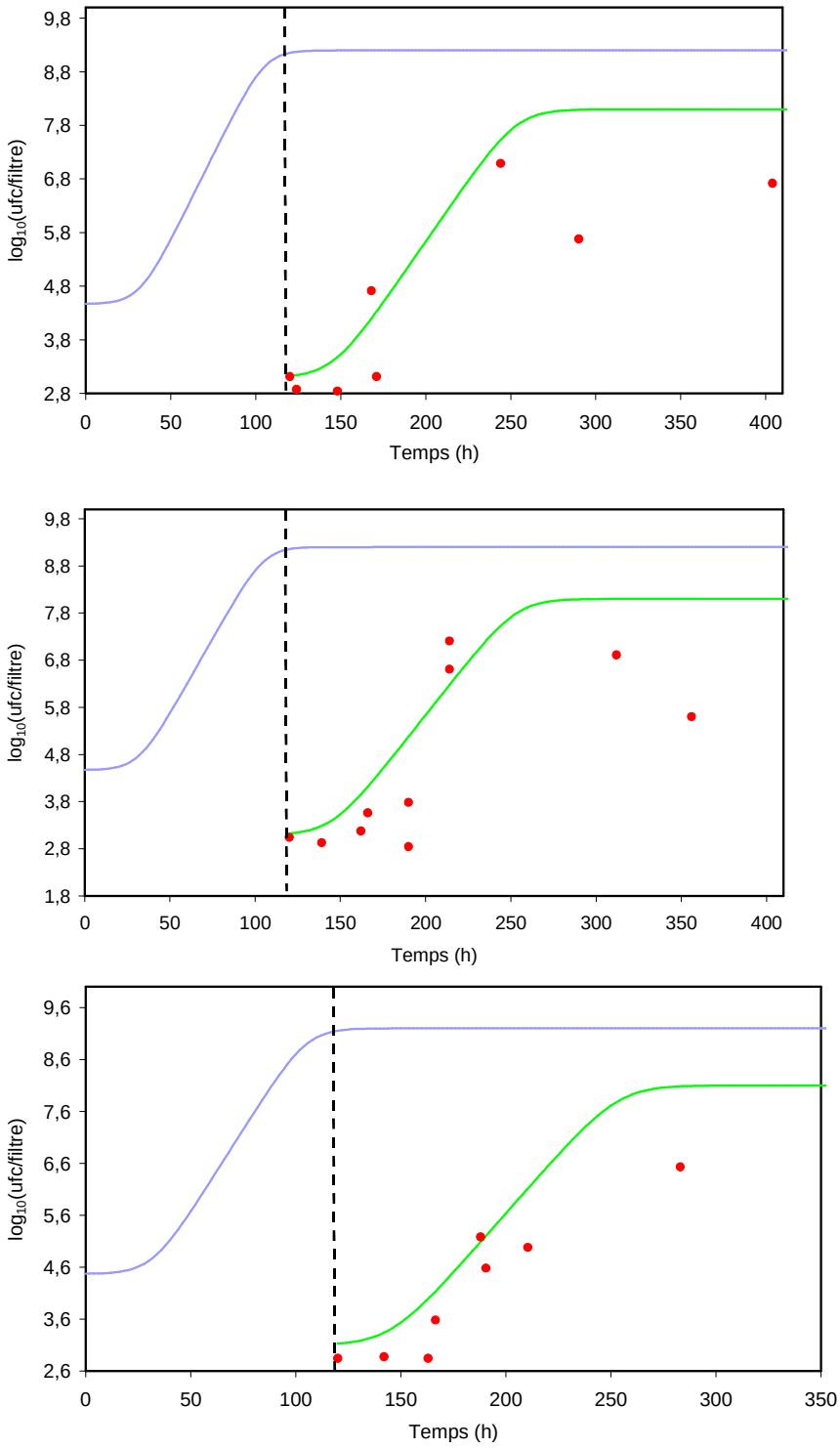


Figure 3a.Co-cultures sur filtres de *L. monocytogenes* AER102 (Lm) et du Consortium Reblochon (CR) à 15°C et 98% HR. N0 Lm : 3 $\log_{10}$(ufc/filtre) ; N0 CR : 9 $\log_{10}$(ufc/filtre). (____) Croissance attendue (monoculture).

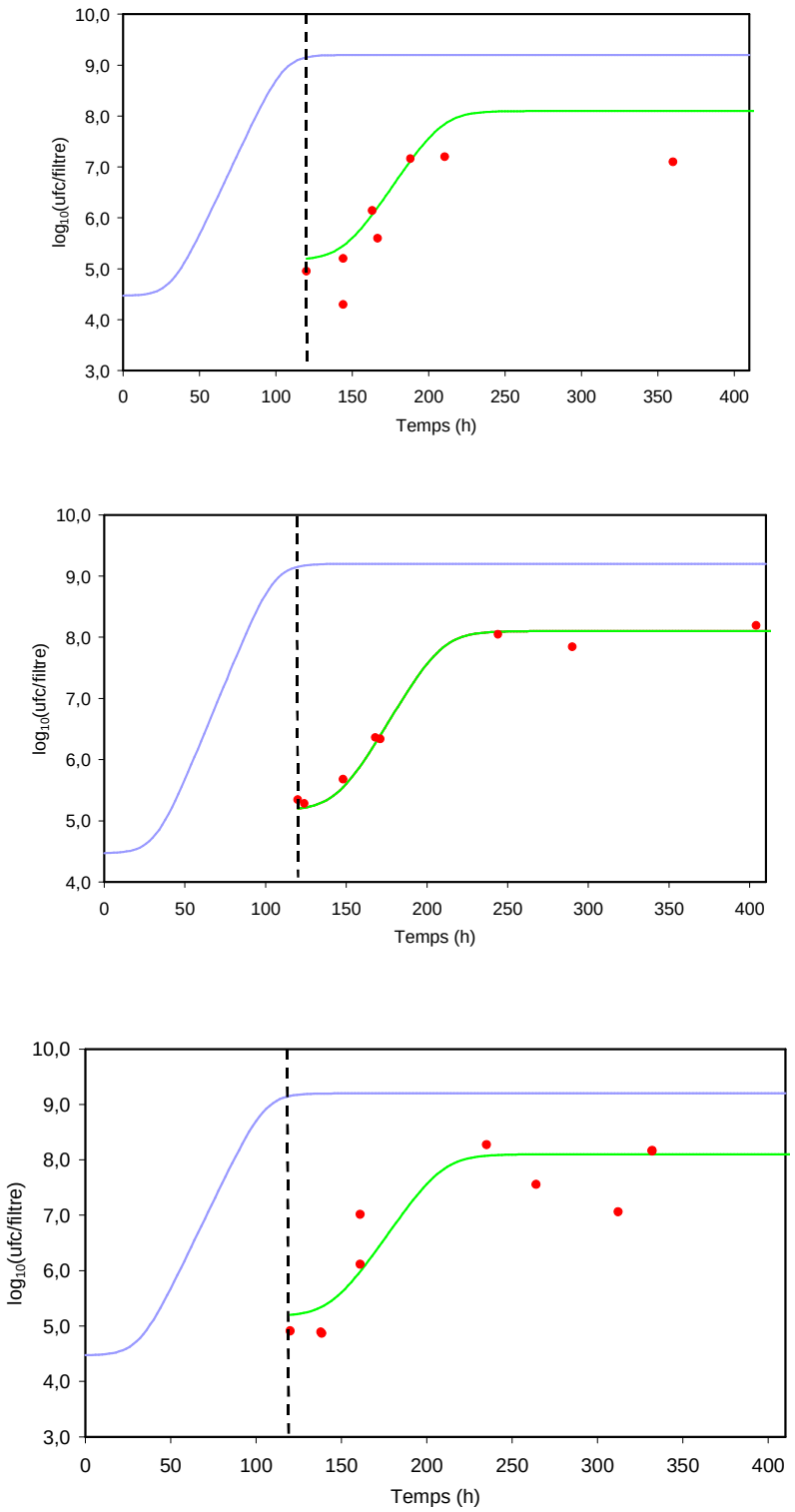


Figure 3b. Co-cultures sur filtres de *L. monocytogenes* AER102 (Lm) et du Consortium Reblochon (CR) à 15°C et 98% HR. N0 Lm : 5 $\log_{10}$(ufc/filtre) ; N0 CR : 9 $\log_{10}$(ufc/filtre). (___) Croissance attendue (monoculture).

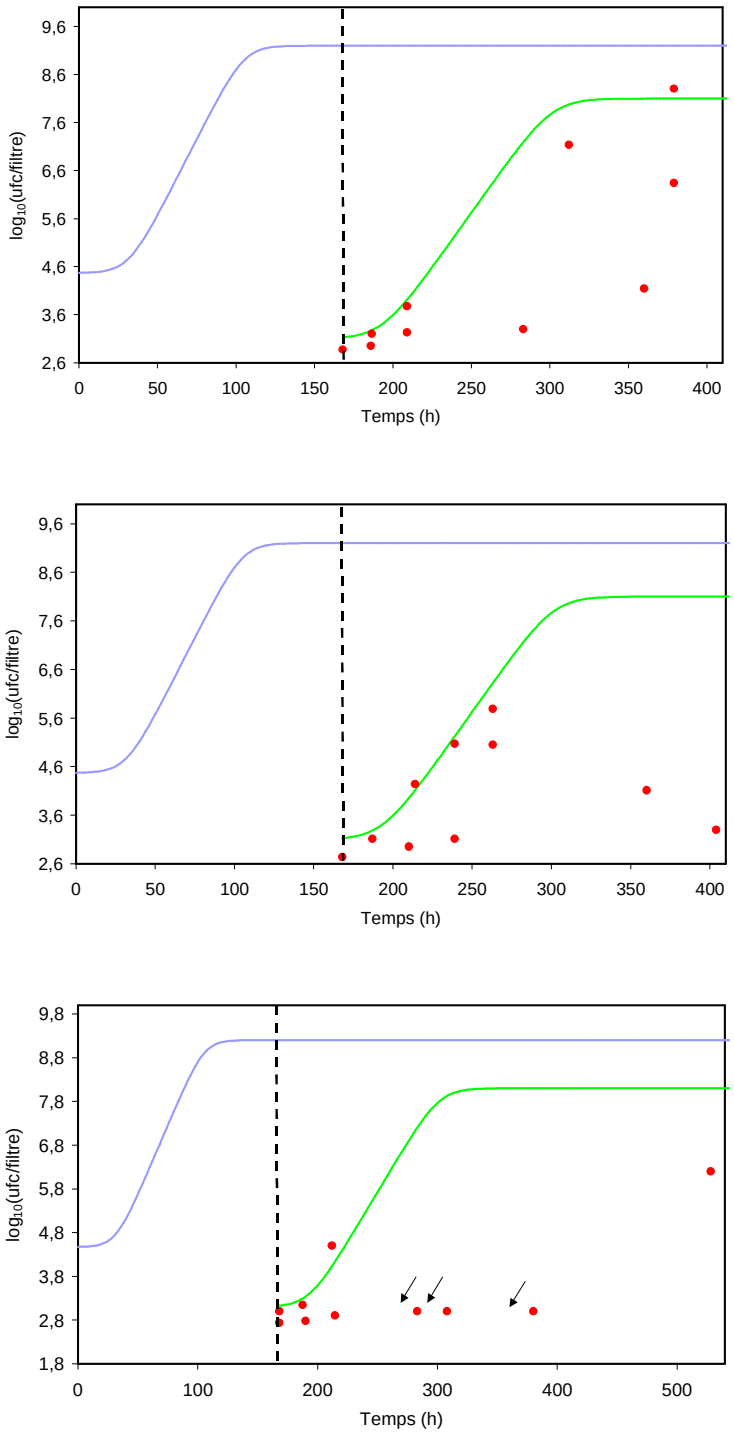


Figure 3c. Co-cultures sur filtres de *L. monocytogenes* AER102 (Lm) et du Consortium Reblochon (CR) à 15°C et 98% HR. N0 Lm : 5 $\log_{10}$(ufc/filtre) ; N0 CR : 9 $\log_{10}$(ufc/filtre) + 2 jours. (___) Croissance attendue (monoculture).

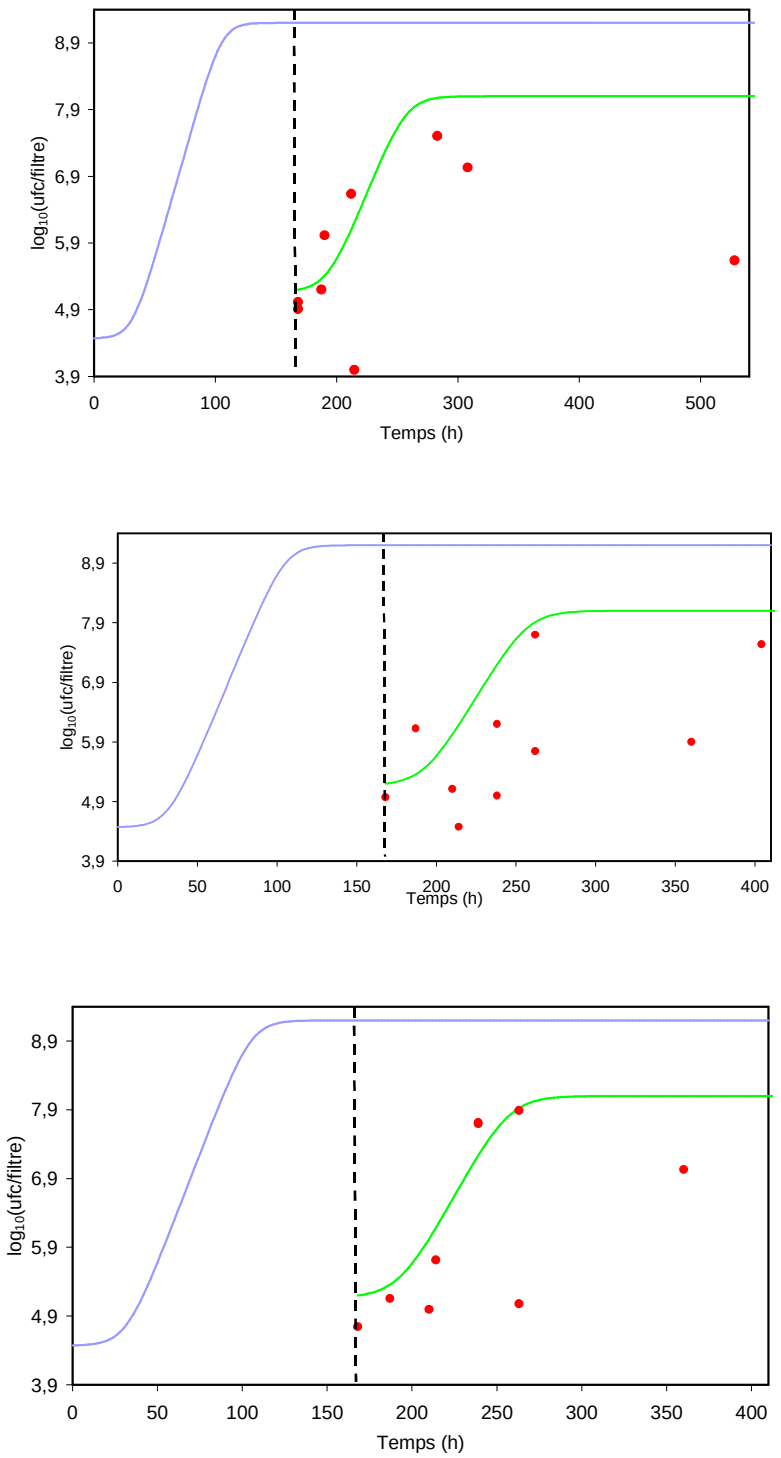


Figure 3d. Co-cultures sur filtres de *L. monocytogenes* AER102 (Lm) et du Consortium Reblochon (CR) à 15°C et 98% HR. N0 Lm : 5 $\log_{10}$(ufc/filtre) ; N0 CR : 9 $\log_{10}$(ufc/filtre) + 2 jours. (___) Croissance attendue (monoculture).

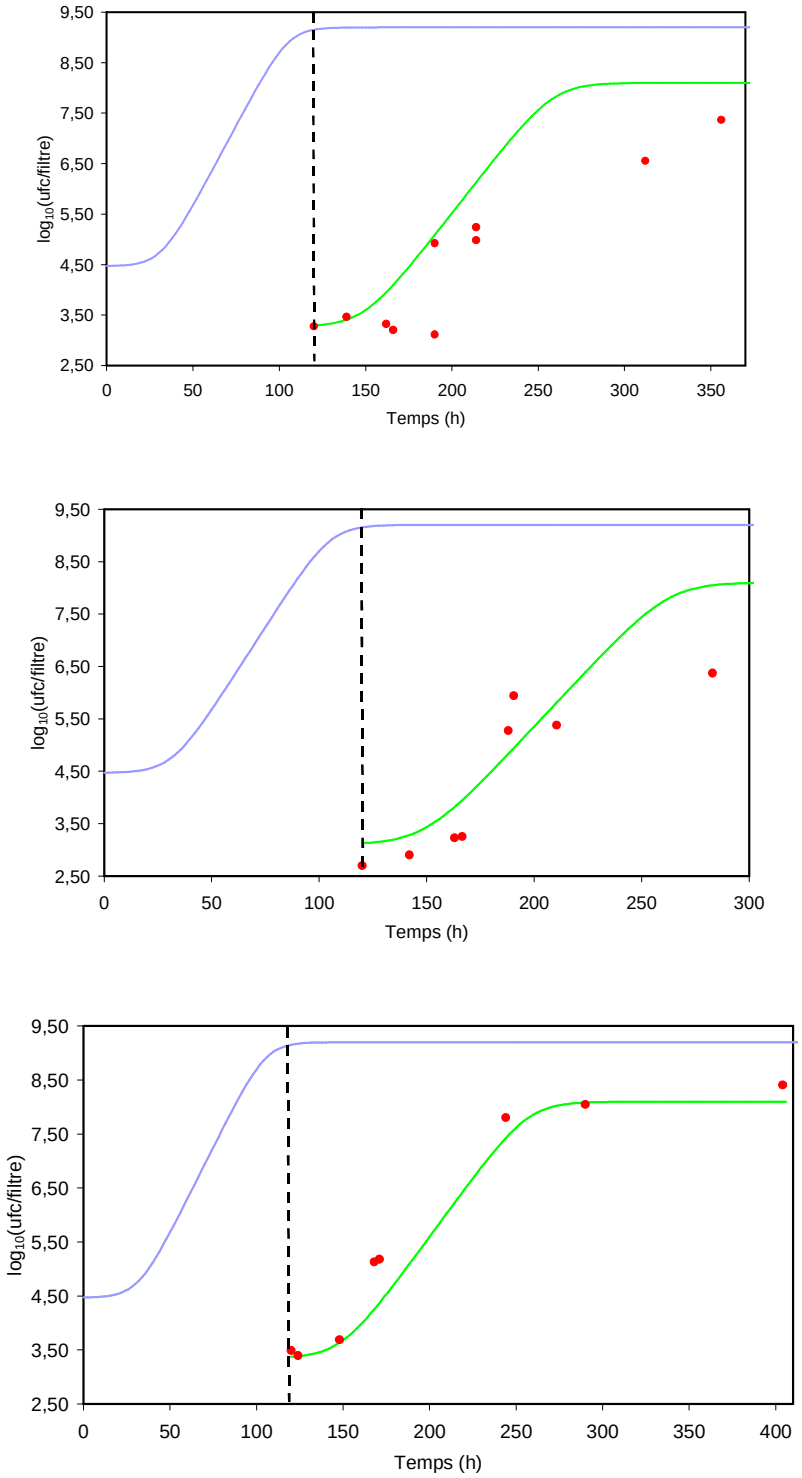


Figure 4a. Co-cultures sur filtres de *L. monocytogenes* SIR (Lm) et du Consortium Reblochon (CR) à 15°C et 98% HR. N0 Lm : 3 $\log_{10}$(ufc/filtre) ; N0 CR : 9 $\log_{10}$(ufc/filtre). (___) Croissance attendue (monoculture).

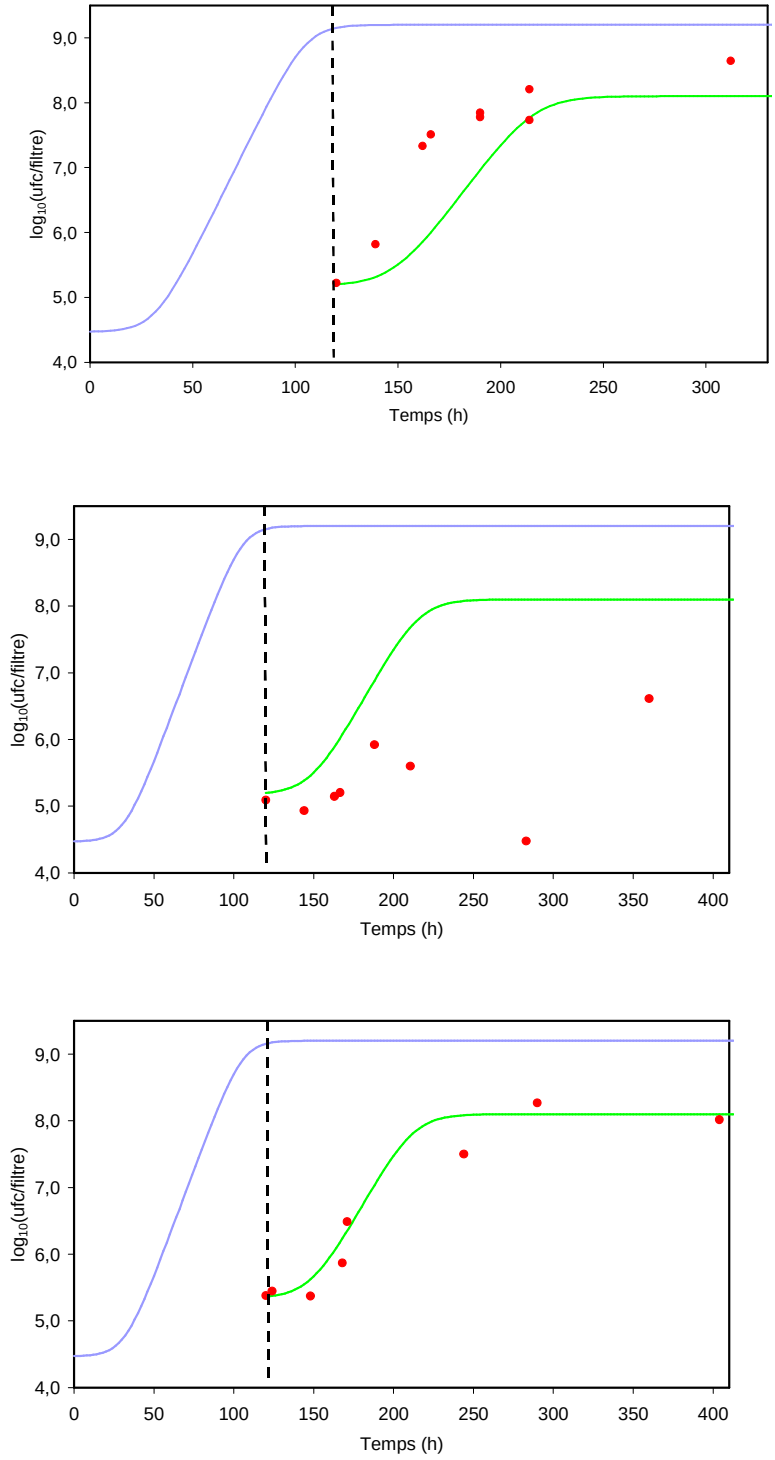


Figure 4b. Co-cultures sur filtres de *L. monocytogenes* SIR (Lm) et du Consortium Reblochon (CR) à 15°C et 98% HR. N0 Lm : 5 $\log_{10}$(ufc/filtre) ; N0 CR : 9 $\log_{10}$(ufc/filtre). (____) Croissance attendue (monoculture).

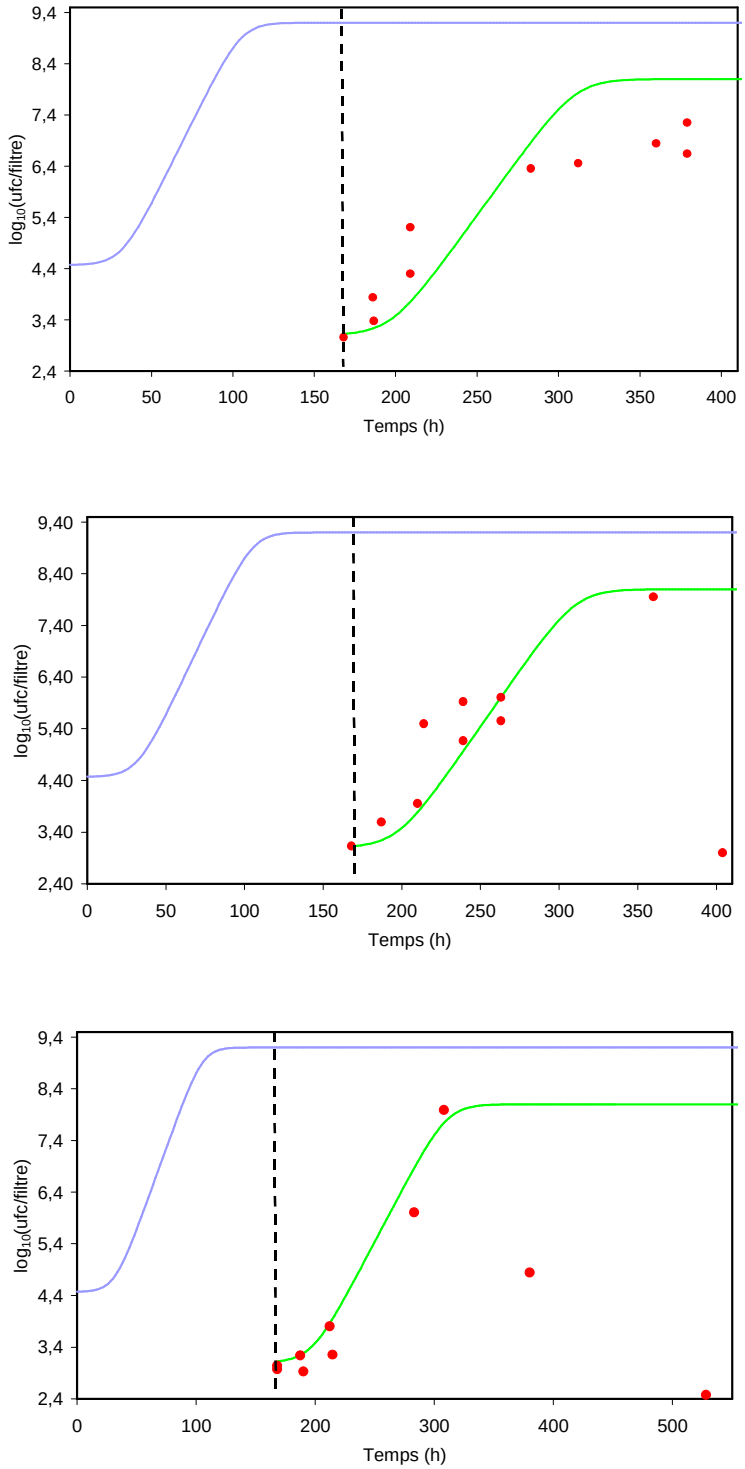


Figure 4c. Co-cultures sur filtres de *L. monocytogenes* SIR (Lm) et du Consortium Reblochon (CR) à 15°C et 98% HR. N0 Lm : 3 $\log_{10}$(ufc/filtre) ; N0 CR : 9 $\log_{10}$(ufc/filtre) + 2 jours. (___) Croissance attendue (monoculture).

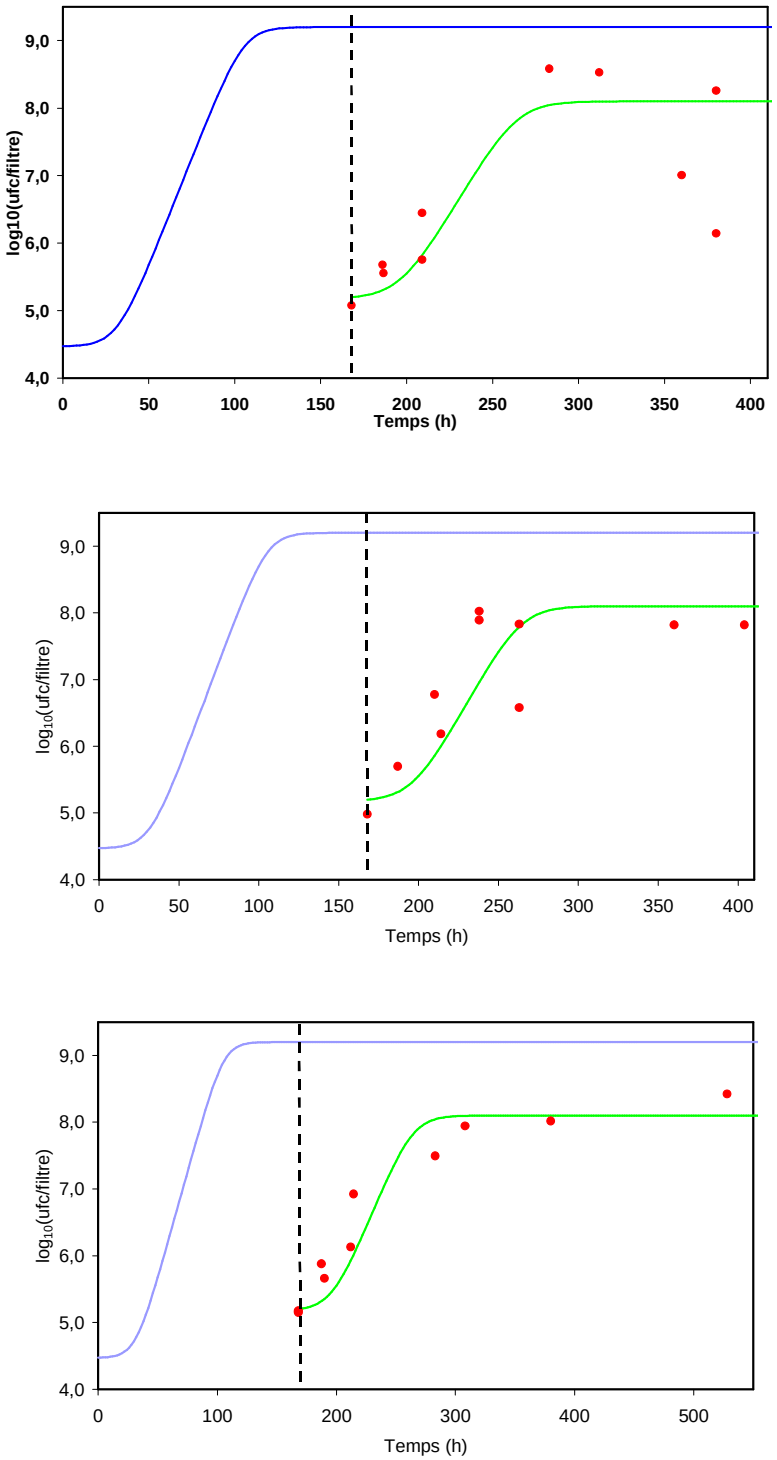


Figure 4d. Co-cultures sur filtres de *L. monocytogenes* SIR (Lm) et du Consortium Reblochon (CR) à 15°C et 98% HR. N0 Lm : 5 $\log_{10}$(ufc/filtre) ; N0 CR : 9 $\log_{10}$(ufc/filtre) + 2 jours. (___) Croissance attendue (monoculture).

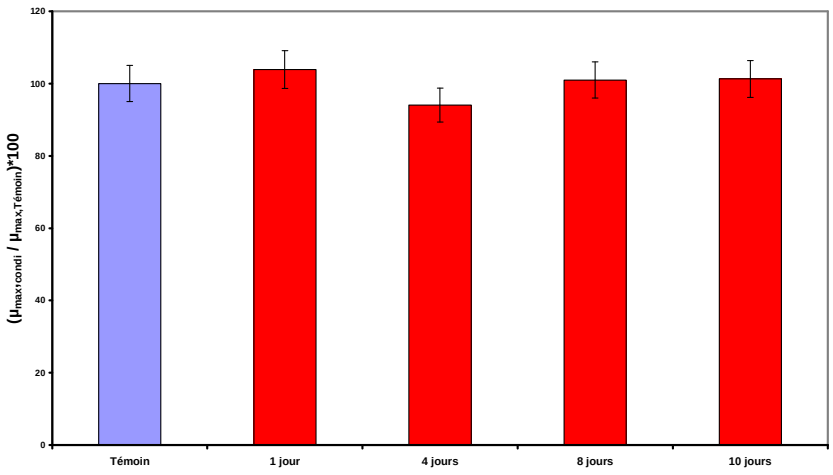


Figure 5. Influence des composés produits pendant la croissance du consortium reblochon à la surface des filtres en fibres de verre sur la croissance de *L. monocytogenes* AER et SIR (données groupées).

3. Conclusions

Contrairement, aux travaux réalisés avec le consortium de Munster étudié en parallèle de cette étude (Figure 6 et Guillier et al. 2006), nous n'avons pas observé une inhibition évidente de la croissance de *L. monocytogenes* de type compétition nutritionnelle. Le consortium reblochon en fin de phase exponentielle et en phase stationnaire influence tout de même le niveau de population maximal atteint par *L. monocytogenes* AER102. L'effet sur la souche SIR est moins marqué voir nul.

Il apparaît également que les composés produits par le consortium reblochon sur les filtres et la matrice fromage ionisé n'a pas d'influence sur le taux de croissance de *L. monocytogenes*.

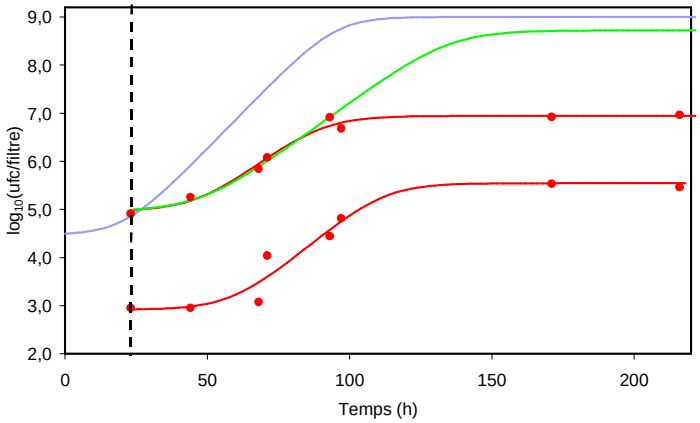


Figure 6. Co-cultures sur filtres de *L. monocytogenes* SIR (Lm) et du Consortium Munster à 15°C et 98% HR. N0 Lm : 3 et 5 $\log_{10}$(ufc/filtre) ; N0 CM : 5 $\log_{10}$(ufc/filtre). (___) Croissance attendue (monoculture).

L'allure erratique des cinétiques de croissance en co-culture pour les deux souches laisse supposer que les conditions physico-chimiques et/ou nutritionnelle sont hétérogènes sur les filtres. De plus les résultats montrent que l'effet inhibiteur du Consortium Reblochon est plus important quand le taux d'inoculation est faible. Une hypothèse peut être alors envisagée : le biofilm développé par le consortium est très hétérogène dans sa structure et Il existe sur le filtre des zones encore favorables à la croissance de *L. monocytogenes*. En déposant un nombre important de cette bactérie sur le biofilm déjà bien implanté, on augmente la probabilité qu'une partie des cellules rencontre des zones favorables à la croissance.

Afin de vérifier cette hypothèse, la même étude pourrait être envisagée avec des niveaux d'inoculation plus réalistes des situations de contamination de terrain (l'influence de la taille de l'inoculum sur la probabilité de croissance de L. monocytogenes a déjà été montrée par ailleurs par Koutsoumanis et Sofos (2005) et Guillier (2005)).

Références.

Augustin, J.-C. (1999). Modélisation de la dynamique de croissance des populations de *Listeria monocytogenes* dans les aliments. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard – Lyon I.

Baranyi, J., Roberts, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int J Food Microbiol 23, 277-294.

Guillier, L. (2005). Variabilité des temps de latence cellulaires de Listeria monocytogenes en fonction des stress subis et des conditions de re-croissance. Thèse de doctorat de l'INA-PG.

Guillier, L., Dubois-Brissonnet, F., Briandet, R. (2006). Compte-rendu des travaux réalisés à l'UMR INRA/ENSIA Bio-adhésion et Hygiène des Matériaux. Compte-rendu du programme ACTIA-BOIS - décembre 2006.

Koutsoumanis, K.P., Sofos, J.N. (2005). Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and aw limits for growth of Listeria monocytogenes. Int J Food Microbiol 104, 83-91.

Tremoulet, F., Duche, O., Namane, A., Martinie, B., Labadie, J.C., European Listeria Genome Consortium (2002). Comparison of protein patterns of Listeria monocytogenes grown in biofilm or in planktonic mode by proteomic analysis. FEMS Microbiol Lett 210, 25-31.

Résumé :

Le bois est un matériau traditionnellement utilisé pour l'affinage des fromages, en raison de ses propriétés hydriques spécifiques. Le caractère ubiquiste de *L. monocytogenes,* bactérie responsable de la listériose, rend la contamination des fromages possible à toutes les étapes de la fabrication. La maîtrise sanitaire de *L. monocytogenes* sur les surfaces en IAA est donc un objectif prioritaire, pour lequel les inhibitions microbiennes peuvent jouer un rôle. L'objectif de ce travail était de vérifier que les planches d'affinage en bois, en condition d'utilisation étaient capables de limiter l'implantation de *Listeria monocytogenes.*

Après l'étude de l'environnement des planches dans les caves de l'affineur partenaire, l'étude de l'écologie microbienne de la surface des planches a mis en évidence la prédominance des flores d'intérêt technologique de surface du reblochon et les faibles dénombrements des flores indésirables. Après contact avec les fromages, le nettoyage-séchage des planches entraîne des modifications du biotope de surface qui le rendent défavorable à la croissance microbienne, sauf pour les flores d'intérêt technologique. L'étude du comportement de *L. monocytogenes* inoculée sur des planches d'affinage a révélé un effet inhibiteur de celles-ci, lié à la présence du biofilm natif, naturellement implanté sur ces planches. Cet effet inhibiteur a été démontré pour 2 souches de *L. monocytogenes* et à 2 stades de prélèvement des planches, dont le stade après nettoyage, le plus exposé au risque d'introduction de *L. monocytogenes* dans les caves. La coexistence de plusieurs mécanismes est suggérée avec un mécanisme inhibiteur principal par compétition nutritionnelle.

mots clés : bois, fromage, biofilm, affinage, inhibition, *Listeria monocytogenes*

Abstract :

Wood has a long tradition as a natural material used in cheese ripening. Dairy products have been implicated in several outbreaks of listeriosis. On account of its ubiquitous nature, *Listeria monocytogenes* can contaminate cheeses all along the production chain. Protective cultures can help to protect the food environment from this pathogenic bacteria. The aim of the study was to confirm that the wooden ripening shelves could limit the implantation of *Listeria monocytogenes*.

After the study of the environment of wooden ripening shelves in the ripening rooms of the ripening partner, the microbial ecology of the surface of the ripening shelves revealed the predominance of the technological microflora and the low levels of undesirable microflora. At the end of the ripening, the high compatibility of the shelves' surface conditions with microbiological life has been demonstrated. On the contrary, after contact with cheeses, the brushing and drying of the shelves modified the microbial environment, where only technological micro-organisms could grow. An inhibitory effect on the two strains of *L. monocytogenes* tested was observed on wooden ripening shelves settled by a living microbial biofilm. This inhibitory effect was demonstrated for two steps of the ripening cycle of the shelves, including the step the most exposed to the introduction of *L. monocytogenes* in the ripening rooms. Several mechanisms have been suggested: competition for nutrient as the main mechanism and the presence of inhibitory substances.

Key words : wood, cheese, biofilm, ripening, inhibition, *Listeria monocytogenes*