

1 **La réalisation de tests de provocation et d'études de vieillissement pour**
2 **évaluer la croissance de *Listeria monocytogenes* au sein des denrées**
3 **alimentaires : le cas des produits laitiers fermiers**

4 Amaury Gérard¹, Soundous El-Hajjaji¹, Georges Daube², Marianne Sindic¹

5 ¹*Laboratoire Qualité et Sécurité des Produits Agroalimentaires, Gembloux Agro-Bio Tech,*
6 *Université de Liège, Passage des Déportés, 2, Gembloux, Belgique.*

7 ²*Faculté de Médecine Vétérinaire, Département des Sciences des Denrées Alimentaires,*
8 *FARAH, Université de Liège, Sart-Tilman, B43b, 4000 Liège, Belgique.*

9
10 **Résumé**

11 *Listeria monocytogenes* est la bactérie pathogène responsable de la listériose, une toxi-
12 infection d'origine alimentaire dont le nombre de manifestations n'a cessé d'augmenter
13 depuis une dizaine d'années au sein de l'Union européenne. En 2018, cette toxi-infection s'est
14 traduite par la mort de plus de 15 % des personnes infectées. De nombreux aliments sont
15 susceptibles de permettre la croissance de ce pathogène, ou au minimum sa survie. Parmi les
16 techniques disponibles pour évaluer la croissance de *L. monocytogenes* au sein d'une denrée
17 alimentaire figurent les tests de provocation et les études de vieillissement. La première
18 méthode consiste en une inoculation de la bactérie au sein ou en surface du produit à étudier,
19 ce dernier étant ensuite conservé jusqu'à sa date limite de consommation. Les niveaux de
20 contaminations initiale et finale permettent alors de calculer un potentiel de croissance et de
21 se prononcer quant aux risques pour la sécurité sanitaire liés à la présence de
22 *L. monocytogenes* au sein de l'aliment concerné. Les études de vieillissement se basent quant
23 à elles sur une contamination naturelle de la denrée alimentaire par *L. monocytogenes*. Dans

24 ce cas, le lot contaminé complet doit être conservé jusqu'à la date limite de consommation. La
25 proportion des unités dépassant la limite de 100 ufc/g est alors calculée. Le Laboratoire
26 Qualité et Sécurité des Produits Agroalimentaires de Gembloux Agro-Bio Tech – Université
27 de Liège a fait de l'étude de la croissance de *L. monocytogenes* au sein des produits laitiers
28 fermiers l'une de ses principales thématiques de recherche.

29 **Overzicht**

30 *Listeria monocytogenes* is een ziekteverwekkende kiem die listeriose veroorzaakt. Listeriose
31 is een voedseltoxi-infectie van wie het aantal gevallen heeft gestegen in de afgelopen tien
32 jaren in de Europese Unie. In 2018 overleden 15 % van de slachtoffers van de listeriose. Een
33 grote aantal voedsel zouden de ontwikkeling van *L. monocytogenes* mogelijk kunnen maken.
34 Challenge-testen en houdbaarheidstesten zijn twee van de huidige technieken om de
35 groeimogelijkheden van *L. monocytogenes* in voedsel te studeren. Tijdens challenge-testen is
36 de bacterie in voedsel geïnoculeerd, of wordt op voedsel oppervlakte verspreid. Voedsel
37 wordt dan tot de vervaldatum bewaard. Eindelijk is het mogelijk om een groeipotentieel te
38 berekenen met het verschil tussen initiële en uiteindelijke besmettingen. Dankzij dit
39 groeipotentieel van *L. monocytogenes* kan het risico voor voedselveiligheid bepaald worden.
40 Als voedsel met *L. monocytogenes* in een hoeve of een bedrijf besmet is kan men een
41 houdbaarheidstest beginnen. De hele besmet partij moet tot het vervaldatum bewaard worden.
42 Het aantal monsters met een besmetting hoger dan 100 kve/g is dan berekend. Het onderzoek
43 op de groeimogelijkheden van *L. monocytogenes* in hoeve zuivelproducten is nu een centraal
44 thema voor de Laboratorium voor Voedselmiddelen Kwaliteit en Veiligheid van Gembloux
45 Agro-Bio Tech – Universiteit van Luik.

46 **Summary**

47 *Listeria monocytogenes* is the pathogenic bacterium responsible for listeriosis, a foodborne
48 disease for which an increasing number of cases has been observed during the last 10 years in
49 the European Union. During the year 2018, this foodborne disease led to the death of 15 % of
50 the contaminated people. Numerous types of food could allow the survival or the growth of
51 this pathogen. Challenge-tests and shelf-life studies are two available techniques to assess the
52 growth of *L. monocytogenes* in food. Challenge-tests require the bacterium to be inoculated
53 into the studied product or sprayed onto its surface. Food is then stored until the end of shelf-
54 life. Initial and final contamination levels allow to calculate a growth potential and to assess
55 the risk associated with the presence of *L. monocytogenes* in this food for food safety. Shelf-
56 life studies are based on naturally occurring contaminations of food. In this case, the
57 contaminated batch is stored until the end of shelf-life. The ratio of samples with a
58 contamination level higher than 100 cfu/g is then calculated. The study of the growth of
59 *L. monocytogenes* in dairy product has become the main research area of the Laboratory for
60 Quality and Safety of Agro-Food Products from Gembloux Agro-Bio Tech – University of
61 Liège.

62

63 **1. Introduction**

64 En 2018, 2.549 cas de listériose invasive ont été identifiés au sein de l'Union Européenne.
65 Cette maladie, bien que bénigne pour une grande partie de la population, s'avère extrêmement
66 dangereuse pour les personnes à risques, comprenant les personnes âgées ou
67 immunodéprimées, ainsi que les femmes enceintes et les nouveau-nés. Concernant ces
68 derniers, l'infection se produit *in utero* ou lors de l'accouchement et non pas par ingestion.
69 Pour ces populations, l'infection peut mener à des conséquences aussi graves que

70 l'avortement, la naissance d'enfants mort-nés, la septicémie, ou la méningite. Elle a conduit à
71 la mort de 15 % des patients en 2018 (1).

72 La grande majorité des cas de listériose (environ 99 %) sont attribués à la consommation
73 d'aliments contaminés par *L. monocytogenes*. Ainsi, la bactérie a déjà été isolée au sein de
74 bon nombre de denrées alimentaires, incluant les poissons fumés, les fruits de mer, les
75 charcuteries, le maïs, les melons, et bien sûr les produits laitiers. Les fromages font par
76 exemple partie des produits alimentaires présentant un pourcentage d'occurrence de
77 *L. monocytogenes* relativement élevé (2).

78 Le Règlement (CE) n° 2073/2005 décrit les critères microbiologiques applicables aux denrées
79 alimentaires. L'annexe I de ce règlement se compose de trois chapitres :

- 80 - Chapitre 1 : Critères de sécurité des denrées alimentaires ;
- 81 - Chapitre 2 : Critères d'hygiène des procédés ;
- 82 - Chapitre 3 : Règles de prélèvement et de préparation des échantillons à analyser.

83 Le chapitre 1 de l'annexe I reprend sous forme de tableau les critères de sécurité relatifs à la
84 présence de *L. monocytogenes* au sein des denrées alimentaires. Le Tableau 1 ci-après a été
85 simplifié à partir de cette source. En résumé, trois catégories de denrées alimentaires sont à
86 distinguer vis-à-vis de *L. monocytogenes*. Les denrées destinées aux nourrissons et à des fins
87 médicales spéciales constituent la catégorie 1.1 et le pathogène ne doit pas pouvoir être
88 détecté dans 25 g de produit tout au long de sa durée de vie. La catégorie 1.2 reprend les
89 denrées n'ayant pas de telles applications, mais qui permettent la croissance de
90 *L. monocytogenes*. Pour ce type de produit, le niveau de contamination par le pathogène ne
91 doit jamais dépasser 100 ufc/g en cours de conservation. En outre, la non détection du
92 pathogène est imposée dans 25 g de produit avant sa mise sur le marché, à moins que le
93 producteur soit à même de démontrer que *L. monocytogenes* n'est pas capable de se

94 développer jusqu'à un niveau de 100 ufc/g au sein de la denrée concernée. Enfin, les produits
95 non destinés aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales et ne permettant pas la
96 croissance de *L. monocytogenes* sont repris dans la catégorie 1.3. Des valeurs-seuils de pH et
97 d' a_w en deçà desquelles le pathogène n'est pas à même de se développer au sein des aliments
98 ont été définies, permettant de classer ces derniers dans la catégorie 1.2 ou 1.3. Ainsi, sur base
99 de données de croissance tirées de la littérature scientifique, il est suggéré que le pathogène ne
100 peut pas se développer à des pH inférieurs à 4,4, ou à des a_w inférieures à 0,92, ou lorsque des
101 pH inférieurs à 5,0 et des a_w inférieures à 0,94 sont rencontrés simultanément (3)(4).

102 Etant données les connaissances actuelles, la plupart des produits laitiers sont à classer dans la
103 catégorie 1.2 du chapitre 1 de l'annexe I du Règlement (CE) n° 2073/2005.

104 Ils doivent donc être exempts du pathogène lors de sa mise sur le marché. Ce critère
105 microbiologique est assez complexe à respecter. En effet, *L. monocytogenes* est une bactérie
106 ubiquiste, dont les réservoirs principaux sont les sols et les eaux de surface ou souterraines.
107 En plus de sa résistance à de faibles pH, *L. monocytogenes* est également psychrotrophe,
108 parvenant à se développer pendant un stockage réfrigéré. Elle est également halotolérante,
109 pouvant parfois survivre plusieurs années dans des saumures saturées en sel, utilisées pour le
110 salage des fromages. Elle peut également survivre à de faibles concentrations en oxygène.

111 Enfin, ce pathogène est également capable de s'implanter au sein des entreprises
112 agroalimentaires sous forme de biofilms (1). Les biofilms de *L. monocytogenes* sont résistants
113 aux produits désinfectants (5). Leur présence peut conduire à une dissémination du pathogène
114 à travers l'équipement et l'environnement de transformation. Bien que les processus
115 thermiques comme la pasteurisation sont souvent utilisés, surtout en industrie, pour détruire
116 un grand nombre de bactéries, une contamination post-pasteurisation reste toujours possible
117 (6). En conséquence, la pression sur les producteurs de produits considérés comme « à
118 risque » est extrêmement forte. Les conséquences économiques et psychologiques d'une

119 simple présence de *L. monocytogenes* peuvent être désastreuses pour les producteurs, en
120 particulier pour les artisans. En effet, la présence de la bactérie dans les denrées nécessite
121 l'arrêt de la production et la notification du problème auprès de l'Agence Fédérale pour la
122 Sécurité de la Chaîne Alimentaire (AFSCA). Comme le soulignent Aurélie Lainé, Juliette de
123 Laubier, Vivianne Patz et Marianne Sindic dans leur article repris au sein de ce numéro
124 spécial, la démarche à appliquer avant la reprise des activités de vente est parfois très longue
125 et fastidieuse.

126 Néanmoins, pour affiner le classement des denrées alimentaires dans les catégories définies
127 par le règlement européen, et donc faciliter les démarches en cas de contamination, les
128 producteurs sont autorisés à démontrer que *L. monocytogenes* n'est pas capable de se
129 développer au sein de leurs produits. En cas de résultats démontrant la non croissance du
130 pathogène en cours de stockage, ces denrées peuvent entrer dans la catégorie 1.3 du
131 Règlement (EC) n° 2073/2005. En cas de croissance limitée, c'est-à-dire ne permettant pas
132 d'atteindre 100 ufc/g en cours de durée de vie, un critère assoupli peut également être accordé
133 aux producteurs. Différentes approches peuvent être envisagées, telles que les études de
134 vieillissement ou les tests de provocation. Ces deux méthodes ont pour objectif d'analyser
135 l'évolution d'une contamination naturelle ou artificielle par *L. monocytogenes*,
136 respectivement, au cours de la conservation d'un produit jusqu'à sa date limite de
137 consommation (DLC). Une troisième approche, plus complexe à mettre en œuvre, peut
138 également être envisagée : les challenge-tests dits « de procédé ». Ces derniers consistent à
139 fabriquer la denrée alimentaire à partir de matières premières artificiellement contaminées par
140 *L. monocytogenes*. La mise en œuvre de ces différentes méthodes se base sur trois documents
141 fondamentaux. Deux d'entre eux sont des références européennes : un guide technique du
142 laboratoire de référence de l'Union européenne pour *Listeria monocytogenes* (EURL Lm) et
143 un document de travail de la Direction Générale pour la santé et la sécurité alimentaire (7)(8).

144 En Belgique, un troisième document de référence a été produit par le Comité Scientifique de
145 l'AFSCA, spécifique aux fromages (9).

146 Le présent article vise à présenter la démarche de réalisation de tests de provocation et
147 d'études de vieillissement dans le but d'évaluer le potentiel de croissance de la bactérie
148 pathogène *L. monocytogenes* au sein des denrées alimentaires. Une étude de cas récente est
149 également proposée pour chacune de ces deux approches, relative aux fromages fermiers et
150 aux beurres au lait cru, respectivement.

151 **2. Etudes de croissance de *L. monocytogenes* au sein des denrées alimentaires**

152 **2.1. Les tests de provocation**

153 **2.1.1. Principe**

154 Les tests de provocation peuvent être définis comme des expériences scientifiques visant à
155 évaluer la croissance d'une bactérie au sein d'une denrée alimentaire, la contamination initiale
156 résultant d'une inoculation artificielle de l'agent étudié. Deux types de tests de provocation
157 peuvent être envisagés : l'étude du potentiel de croissance de la bactérie, ou l'étude de son
158 taux de croissance. Le présent article s'intéresse au cas particulier des tests de provocation
159 pour la détermination du potentiel de croissance de *L. monocytogenes*. La valeur de ce
160 potentiel de croissance permettant de déterminer si la denrée permet ou non la croissance du
161 pathogène étudié et de la classer dans la catégorie adéquate du règlement européen. Pour avoir
162 une valeur probatoire, les tests de provocation doivent être réalisés par des laboratoires
163 accrédités pour ce paramètre.

164 *a. Echantillonnage*

165 Une attention toute particulière doit être prêtée à la sélection d'échantillons couvrant la
166 variabilité inhérente au produit. En effet, les procédés et produits artisanaux se caractérisent
167 par une variabilité importante, que ce soit dans le respect scrupuleux des températures, des

168 doses et des durées des différentes étapes, ou concernant les caractéristiques des produits finis
169 (pH, a_w , masse,...). Ainsi, il est généralement admis qu'une analyse sur trois lots permet de
170 couvrir cette variabilité. Toutefois, l'EURL *Lm* a développé un calculateur permettant
171 d'évaluer la variabilité inter-lots et de déduire le nombre de lots à analyser. Pour chacun des
172 lots, trois répétitions doivent être réalisées, au minimum. Ainsi, il est conseillé d'analyser un
173 minimum de trois échantillons contaminés à J0 et à DLC, accompagnés de trois échantillons
174 témoins non contaminés.

175 *b. Choix des souches de L. monocytogenes et inoculation*

176 Préalablement à la réalisation des tests de provocation, il convient de sélectionner
177 adéquatement les souches de *L. monocytogenes* à inoculer. Ainsi, il est plus que conseillé
178 d'opter pour des souches isolées à partir de denrées alimentaires similaires. Par exemple, en
179 cas de test de provocation sur du fromage, le choix de souches isolées et identifiées à partir de
180 produits laitiers s'impose naturellement. L'EURL *Lm* a constitué une banque de souches de
181 *L. monocytogenes* complètement caractérisées (10). Ces souches sont fournies aux
182 laboratoires sous forme de billes pouvant aisément être mises en culture. Les lignes directrices
183 de l'EURL *Lm* autorisent l'utilisation d'un minimum de deux souches, mais il est
184 généralement recommandé de procéder à l'inoculation d'un cocktail composé de trois souches
185 de *L. monocytogenes*.

186 Parfois, en raison du caractère pathogène de *L. monocytogenes*, certains optent
187 préférentiellement pour des souches de *Listeria innocua* pour la réalisation de tests de
188 provocation. Cette bactérie du genre *Listeria* est certifiée non pathogène pour l'homme et les
189 animaux. Toutefois, ces souches doivent être utilisées avec prudence, et des études de
190 croissance préalables sont indispensables, afin d'identifier une ou plusieurs souches se
191 comportant précisément comme *L. monocytogenes* dans les conditions étudiées.

192 Des consignes précises sont fournies concernant l'inoculation de la bactérie au sein de la
193 denrée alimentaire à étudier. Tout d'abord, la mise en culture des cellules de
194 *L. monocytogenes* doit suivre un protocole précis rédigé par l'EURL *Lm*. Il est également
195 conseillé d'adapter le pH et l' a_w de la culture cellulaire afin d'acclimater les cellules
196 bactériennes aux conditions rencontrées au sein du produit testé. La question du choix de la
197 zone d'inoculation doit également être posée. En effet, l'objectif du test de provocation est de
198 mimer le scénario de contamination le plus probable de la denrée alimentaire étudiée. Ainsi, si
199 l'aliment est fabriqué à partir de matières premières contaminées, le cocktail doit plutôt être
200 inoculé au cœur du produit. Au contraire, si le scénario le plus probable est une contamination
201 en post-fabrication par des souches de *L. monocytogenes* issues de l'environnement, par
202 exemple implantées dans l'atelier, il convient d'opter pour une contamination artificielle de la
203 surface de l'aliment. Dans le cas de charcuteries ou de fromages, une inoculation de la surface
204 de coupe peut également être envisagée.

205 Dans tous les cas, l'opérateur doit accomplir une inoculation aussi homogène que possible.
206 L'inoculum doit être calculé pour cibler un niveau de contamination d'environ 100 ufc/g de
207 denrée. Le volume total de l'inoculum et le nombre de piqûres doivent être définis en fonction
208 de la concentration cellulaire de la suspension de *L. monocytogenes*. Une contamination trop
209 faible pourrait conduire à des conclusions erronées. En effet, la variabilité d'état
210 physiologique des cellules individuelles peut entraîner un biais non négligeable. Une
211 contamination plus importante permet de minimiser ce biais. A l'inverse, en cas d'inoculation
212 trop élevée, *L. monocytogenes* est susceptible de se retrouver en position de force par rapport
213 aux microflores microbiennes résidentes, ce qui n'est en aucun cas représentatif d'une
214 contamination naturelle, et pourrait donc conduire aussi à des conclusions biaisées.

215 Lors de tests de provocation, d'autres consignes relatives à l'inoculation sont encore à
216 respecter. Par exemple, l'inoculum ne peut dépasser 1 % du volume ou de la masse du produit

217 à étudier. Des volumes d'inoculation trop conséquents pourraient en effet engendrer des
218 modifications de leurs caractéristiques physico-chimiques propres.

219 *c. Conservation des produits*

220 Au cours de tests de provocation, le choix du schéma de conservation doit être guidé par le
221 parcours réel du produit testé lorsqu'il se retrouve sur le marché. Ainsi, l'EURL *Lm* a par
222 exemple proposé des schémas de températures permettant de mimer trois étapes
223 primordiales : la phase de stockage des denrées entre la fabrication et la mise en étalage, le
224 stockage en étalage, et la conservation chez le consommateur (Tableau 2).

225 *d. Analyses physico-chimiques et microbiologiques*

226 Les échantillons inoculés et les témoins doivent faire l'objet de diverses analyses physico-
227 chimiques et microbiologiques à J0 et à la DLC. *L. monocytogenes* est dénombrée au sein de
228 chacun des témoins et des échantillons inoculés, les dénombrements sur les témoins
229 permettant de vérifier l'absence de contamination des denrées échantillonnées par le
230 pathogène. Selon le produit étudié, les témoins peuvent faire l'objet d'analyses
231 supplémentaires. Ainsi, le guide technique de l'EURL *Lm* recommande par exemple de
232 mesurer le pH et l' a_w d'au moins un des témoins à J0 et à la DLC. De même, des
233 caractérisations complémentaires de composition des produits peuvent être réalisées,
234 comprenant par exemple la détermination des teneurs en matière sèche, en graisse, en
235 protéines, ou en sel. Il peut également être intéressant d'étudier la microflore résidente des
236 denrées étudiées, mais aucun conseil n'est fourni par le guide technique.

237 *e. Conclusions des tests*

238 Une fois les tests de provocation menés à leur terme, le potentiel de croissance peut être
239 calculé pour chaque lot. A partir des dénombrements, exprimés sous forme de logarithme en

240 base 10 des ufc/g, les contaminations médianes à J0 et à la DLC doivent être calculées. Le
241 potentiel de croissance peut alors être obtenu en calculant la différence entre les médianes à
242 JDLC et à J0. Ainsi, une croissance de *L. monocytogenes* en cours de stockage se traduit par
243 un potentiel de croissance positif, et inversement pour une décroissance. La valeur de
244 potentiel de croissance la plus élevée parmi les lots testés, constituant un *worst case*, est
245 retenue comme résultat pour le test de provocation.

246 La conclusion du test est la suivante : si le potentiel de croissance est inférieur ou égal à 0,5
247 \log_{10} ufc/g, il est admis que la denrée alimentaire n'est pas susceptible de favoriser la
248 croissance de *L. monocytogenes*. L'aliment peut donc être considéré comme appartenant à la
249 catégorie 1.3 du Règlement (EC) n° 2073/2005. Au contraire, si le potentiel de croissance est
250 supérieur à 0,5 \log_{10} ufc/g, la denrée permet le développement du pathogène et reste classée
251 dans la catégorie 1.2 du même règlement. Toutefois, le critère à respecter en sortie de
252 production peut être adapté en cas de croissance faible.

253 **2.1.2. Exemple des fromages fermiers belges**

254 Récemment, le Laboratoire Qualité et Sécurité des Produits Agroalimentaires de Gembloux
255 Agro-Bio Tech – Université de Liège a pris part à un projet d'ampleur financé par l'AFSCA
256 visant à étudier le potentiel de croissance de *L. monocytogenes* au sein des fromages fermiers
257 belges. Par l'adjectif « fermier », il est admis que la production laitière d'une exploitation y
258 est directement transformée.

259 Les producteurs de fromage fermier sont tenus de se conformer aux exigences réglementaires
260 européennes en ce qui concerne la présence de *L. monocytogenes* au sein de leurs fromages.
261 Ainsi, ils doivent garantir la non détection du pathogène dans 25 g de produit, juste avant sa
262 mise sur le marché, étant donné que les fromages présentent généralement des pH et a_w
263 supérieurs aux valeurs-seuils fixées par le règlement.

264 Le projet visait à réaliser des tests de provocation en vue d'identifier d'éventuels fromages
265 fermiers ne permettant pas la croissance de *L. monocytogenes*. Après plusieurs étapes de
266 caractérisation des fromages, 32 fromages fermiers belges ont été sélectionnés, comprenant
267 des pâtes pressées, des pâtes molles et des pâtes fraîches. Le panel comprenait des fromages
268 fabriqués à partir de lait cru ou pasteurisé. L'origine animale du lait variait également : lait de
269 vache, lait de chèvre ou lait de brebis. Pour tous ces produits, trois lots ont généralement été
270 testés. Une dérogation a été accordée à certains fromages, pour lesquels les simulations
271 informatiques n'ont pas montré de croissance de *L. monocytogenes*. Il existe sur internet
272 divers outils de microbiologie prévisionnelle permettant d'évaluer la croissance d'une bactérie
273 donnée tout en mentionnant les conditions physico-chimiques du milieu. Les plateformes
274 Sym'Previus et ComBase figurent parmi les plus utilisées. Ces outils présentent toutefois une
275 limitation majeure : les prévisions de croissance se basent sur des modèles développés en
276 milieux de culture, et non au sein de matrices alimentaires. Ils ont donc la réputation d'être
277 extrêmement conservateurs.

278 Pour l'inoculation, trois souches de *L. monocytogenes* issues de produits laitiers et
279 correspondant aux sérotypes les plus souvent à l'origine de cas de listérioses ont été utilisées.
280 Le cocktail les rassemblant n'a généralement été inoculé qu'au cœur des produits, à
281 l'exception des fromages à pâte molle, pour lesquels la croûte est généralement consommée.
282 Pour ces derniers, une contamination simultanée du cœur et de la surface a été mimée.

283 Selon les types de fromage, les résultats furent contrastés. Pour les onze fromages frais,
284 comprenant des maquées et des fromages moulés, l'ensemble des lots testés ont montré une
285 décroissance du pathogène en cours de stockage, à partir d'une contamination initiale
286 d'environ 100 ufc/g. En conséquence, ces onze produits sont dorénavant considérés comme
287 appartenant à la catégorie 1.3 du Règlement (EC) n° 2073/2005. Cette uniformité dans les

288 résultats suggère qu'une remise en question globale quant à la place de ce type de fromage
289 dans la catégorie 1.2 pourrait être envisagée.

290 Les tests de provocation sur les fromages à pâte molle, tant à croûte fleurie qu'à croûte lavée,
291 ont convergé vers une conclusion opposée. En effet, des croissances très importantes
292 (potentiel de croissance jusqu'à $5 \log_{10}$ ufc/g) ont été observées pour certains lots. Ces
293 fromages doivent donc être considérés comme des produits permettant la croissance du
294 pathogène. Ils doivent aussi être consommés avec prudence, voire évités par les populations à
295 risque.

296 Enfin, les tests de provocation sur les fromages à pâte pressée ont été plus surprenants. Une
297 bonne partie de ces produits n'ont pas favorisé la croissance de *L. monocytogenes*. Cependant,
298 pour quatre d'entre eux, le pathogène a pu se développer dans au moins un des trois lots
299 étudiés. Une telle hétérogénéité entre lots pose question, et il semble que tous les facteurs
300 gouvernant la croissance de *L. monocytogenes* ne soient pas encore compris par les
301 scientifiques.

302 **2.2. Etudes de vieillissement**

303 **2.2.1. Principe**

304 Les études de vieillissement consistent à évaluer le comportement de *L. monocytogenes* dans
305 des produits naturellement contaminés conservés jusqu'à leur date limite de consommation.
306 L'objectif des études de vieillissement est de vérifier que la limite de 100 ufc/g n'est pas
307 dépassée au moment de la consommation. Après une conservation reflétant les conditions
308 réelles de distribution et de stockage du produit testé, comme pour les tests de provocation, la
309 proportion des unités dépassant la limite de 100 ufc/g est calculée à la fin de la durée de
310 conservation. Celle-ci est accompagnée d'un intervalle de confiance qui peut être calculé à
311 l'aide d'un calculateur. Un exemple est fourni par le guide technique de l'EURL *Lm* (7).

312 Contrairement aux tests de provocation, les études de vieillissement sont considérées comme
313 plus réalistes car la contamination est d'origine naturelle. Cependant leur mise en œuvre est
314 compliquée en cas de faible prévalence ou de faibles niveaux de contamination. Ce genre
315 d'étude nécessite aussi une grande quantité du produit pour avoir suffisamment d'échantillons
316 pour couvrir la variabilité intra-lot. L'étape d'échantillonnage est donc importante. Pour la
317 mener à bien, les producteurs des denrées alimentaires peuvent se référer au document « Les
318 directives générales sur l'échantillonnage CAC/GL 50-2004 » du Codex Alimentarius ou à la
319 méthode « échantillonnage aléatoire simple » décrite dans le guide technique de l'EURL *Lm*
320 (7, 11).

321 **2.2.2. Exemple des beurres fermiers belges au lait cru**

322 Dans le cadre d'un projet financé par la région wallonne, une étude a été menée au sein du
323 Laboratoire Qualité et Sécurité des Produits Agroalimentaires de Gembloux Agro-Bio Tech –
324 Université de Liège. L'objectif était d'étudier le potentiel de croissance de *L. monocytogenes*
325 dans le beurre au lait cru par des études de vieillissement.

326 Le beurre au lait cru présente de grandes variations en termes de procédé de production et de
327 caractéristiques physico-chimiques, et principalement de pH (12). Un des objectifs de cette
328 étude était donc de collecter des échantillons d'origines différentes et de compositions
329 physico-chimiques variées.

330 De juin 2016 à juin 2018, 20 études de vieillissement ont été réalisées. Celles-ci ont couvert
331 une large gamme de caractéristiques physico-chimiques, tant en terme de pH que d' a_w . Les
332 beurres étudiés étaient salés ou non, parfois produits avec ajout de ferments. Lorsque des cas de
333 contamination de lots de beurre ont été signalés, ces derniers ont systématiquement été
334 collectés. En fonction de l'âge des produits au moment de leur récupération, les modalités de
335 conservation ont varié. Lorsque les échantillons avaient plus de sept jours lors de la collecte,

336 ils ont été conservés à 12 °C jusqu'à la fin de leur durée de conservation. Dans le cas
337 contraire, ils ont tout d'abord été conservés à 7 °C jusqu'au septième jour après la production,
338 puis stockés à 12 °C pour simuler une rupture de la chaîne du froid. Une durée de vie de 30
339 jours à partir de la date de fabrication a systématiquement été considérée.

340 Pour chaque lot de beurre naturellement contaminé par *L. monocytogenes*, 30 échantillons ont
341 été analysés au début et à la fin de la période de conservation. Sur un total de 600 échantillons
342 analysés (20 études de vieillissement avec 30 répétitions), *L. monocytogenes* a été détectée
343 dans 66 % des cas à J₀. Parmi ceux-ci, 40 % présentaient un niveau de contamination inférieur
344 à 1 log ufc/g, 16 % un niveau entre 1 et 2 log ufc/g, tandis que le niveau de contamination des
345 10 % restants était supérieur à la limite critique de 2 log ufc/g.

346 Pour tous les lots étudiés, aucune croissance n'a été observée en cours de stockage. La
347 proportion estimée d'unités dépassant 2 log ufc/g à la fin de la durée de vie était de 0 % avec
348 un intervalle de confiance à 95 % de [0,0 % - 0,6 %]. Une diminution de *L. monocytogenes* a
349 également été observée dans les échantillons dépassant 2 log ufc/g. L'absence de croissance
350 de *L. monocytogenes* est observée alors que les conditions de pH et d'a_w de ces échantillons
351 de beurre permettent théoriquement la croissance de *L. monocytogenes*.

352 Sur bases des résultats obtenus, le beurre au lait cru est un produit qui ne permettrait pas la
353 croissance de *L. monocytogenes*. Néanmoins, une étude de vieillissement sur des échantillons
354 de beurre au lait cru présentant un pH très élevé (i.e. pH > 6,2) serait intéressante pour
355 conforter ces résultats.

356 **3. Conclusion**

357 La présence de *L. monocytogenes* dans les denrées alimentaires constitue encore à l'heure
358 actuelle un risque pour la sécurité sanitaire des aliments, mais également une menace pour les
359 producteurs devant garantir la sécurité de leurs aliments. Pour évaluer la croissance de

360 *L. monocytogenes* au sein d'une denrée alimentaire, les tests de provocation et les études de
361 vieillissement sont parmi les techniques mises à la disposition des producteurs. Chaque
362 méthode consiste en une démarche particulière répondant à un objectif précis, néanmoins, leur
363 utilisation est sujette à plusieurs contraintes et critiques. Pour le test de provocation, certains
364 estiment qu'une inoculation artificielle au sein d'un produit fini modifie de façon excessive
365 les caractéristiques intrinsèques de ce dernier. Par exemple, les injections créeraient des
366 « cheminées », permettant un contact du cœur du produit avec l'atmosphère environnante. Les
367 études de vieillissement et les challenge-tests de procédé permettent d'éviter ce problème. Ces
368 deux méthodes présentent néanmoins d'autres inconvénients non négligeables. Ainsi, la
369 première requiert des produits naturellement contaminés. Pour étudier trois lots, comme
370 requis, les producteurs ont donc besoin de trois cas de contamination par *L. monocytogenes*,
371 ce qui n'est évidemment pas souhaitable. De plus, la période de temps requise pour rencontrer
372 trois cas de contamination peut s'avérer extrêmement longue. Les challenge-tests de procédé
373 demandent quant à eux de reproduire à l'identique l'ensemble du procédé de fabrication au
374 sein d'un laboratoire de niveau de biosécurité 2 (BL2) ce qui, pour des contraintes logistiques
375 et financières, constitue un gros désavantage. Dans le cas particulier du fromage, il est ainsi
376 extrêmement complexe de reproduire en laboratoire les conditions d'affinage rencontrées au
377 sein des fromageries. Il est important de définir le type d'information recherchée et de
378 conduire au préalable une recherche scientifique pour choisir la méthode adéquate.

379 **Remerciements**

380 Les auteurs remercient le Service Public de Wallonie pour son soutien au laboratoire qualité
381 et sécurité des produits agroalimentaires dans la réalisation des études de vieillissement sur les
382 beurres fermiers au lait cru. L'AFSCA doit également être remerciée pour le financement des
383 tests de provocation sur les fromages artisanaux, de même que le personnel de laboratoire du

384 Vlaams Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO) et Quality Partner s.a. pour la
385 réalisation des analyses physicochimiques et microbiologiques au cours de ces projets.

386 **Références**

387 (1) Gérard, A., S. El-Hajjaji, E. Niyonzima, G. Daube and M. Sindic, 2018. Prevalence and
388 survival of *Listeria monocytogenes* in various types of cheese - A review. *Int. J. Dairy*
389 *Technol.*, 71: 825-843. DOI: 10.1111/1471-0307.12552.

390 (2) European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control
391 (EFSA and ECDC), 2018. The European Union summary report on trends and sources of
392 zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* 16.
393 <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>.

394 (3) Commission Européenne, 2005. Règlement (CE) n° 2073/2005 du 15 novembre 2005
395 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. OJ L, 338: 1-
396 26. Disponible: [https://eurlex.europa.eu/legal-](https://eurlex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:02005R2073-20200308)
397 [content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:02005R2073-20200308](https://eurlex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:02005R2073-20200308) [Consulté le 01 avril 2020].

398 (4) Commission Européenne, 2019. Règlement (UE) 2019/229 de la commission du 7 février
399 2019 modifiant le règlement (EC) n°2073/2005 concernant les critères microbiologiques
400 applicables aux denrées alimentaires en ce qui concerne certaines méthodes, le critère de
401 sécurité des denrées alimentaires relatif à la présence de *Listeria monocytogenes* dans les
402 graines germées, ainsi que le critère d'hygiène du procédé et le critère de sécurité des denrées
403 alimentaires pour les jus de fruits et de légumes non pasteurisés (prêts à être consommés). OJ
404 L, 37 :106-110.

405 (5) Rodríguez-López, P., Rodríguez-Herrera, J., Vázquez-Sánchez, D., López Cabo, M., 2018.
406 Current Knowledge on *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food-Related Environments:

407 Incidence, Resistance to Biocides, Ecology and Biocontrol. *Foods* 7, 85.
408 <https://doi.org/10.3390/foods7060085>

409 (6) Kasalica, A., Vukovic, V., Vranjes, A., Memisi, N., 2011. *Listeria monocytogenes* in milk
410 and dairy products. *Biotechnology in Animal Husbandry* 27, 1067–1082.
411 <https://doi.org/10.2298/BAH1103067K>

412 (7) Laboratoire de référence de l'Union Européenne pour *Listeria monocytogenes*, 2014.
413 EURL *Lm* Technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria*
414 *monocytogenes* in ready-to-eat foods. Disponible:
415 [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_technical_guidance_do](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_technical_guidance_document_listeria_in_rte_foods.pdf)
416 [cument_listeria_in_rte_foods.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_technical_guidance_document_listeria_in_rte_foods.pdf) [Consulté le 10 février 2020].

417 (8) Direction Générale pour la santé et la sécurité alimentaire, 2013. Commission staff
418 working document – Guidance document on *Listeira monocytogenes* shelf-life studies for
419 ready-to-eat foods, under Régulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on
420 microbiological criteria for foodstuffs. Disponible:
421 https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_guidance_document_ly
422 [steria.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_guidance_document_ly) [Consulté le 10 février 2020].

423 (9) Comité Scientifique de l'Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire,
424 2016. Avis 02-2016 relatif aux tests de provocation et tests de vieillissement pour *Listeria*
425 *monocytogenes* dans le fromage (dossier SciCom 2015/17). Disponible :
426 http://www.afsca.be/comitescientifique/avis/2016/_documents/Avis02-
427 [2016Listeriamonocytogenes_website_000.pdf](http://www.afsca.be/comitescientifique/avis/2016/_documents/Avis02-2016Listeriamonocytogenes_website_000.pdf) [Consulté le 10 février 2020].

428 (10) Laboratoire de référence de l'Union Européenne pour *Listeria monocytogenes*, 2013.
429 Development of a Set of *Listeria monocytogenes* Strains for Conducting Challenge Tests

430 Version 0.Disponible: <https://sitesv2.anses.fr/en/system/files/private/LIS-Cr-201317R.pdf>

431 [consulté le 10 février 2020].

432 (11) FAO. 2004. Directives générales sur l'échantillonnage CAC/GL 50-2004. Codex

433 Alimentarius.

434 (12) Comité Scientifique de l'Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire,

435 2016. Avis 09-2016 du comité scientifique de l'AFSCA concernant la croissance de *Listeria*

436 *monocytogenes* dans le beurre fermier à base de lait cru.

437

438 Tableau 1. Critères relatifs à la présence de *L. monocytogenes* au sein des denrées
 439 alimentaires, simplifié à partir du Règlement (CE) N°2073/2005 (3, 4).

| Catégorie de denrées alimentaires | Limites | Stade d'application |
|--|--------------------------------------|--|
| 1.1 Denrées alimentaires prêtes à être consommées destinées aux nourrissons et denrées alimentaires prêtes à être consommées destinées à des fins médicales spéciales | Non détection dans 25 g | Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation |
| 1.2 Denrées alimentaires prêtes à être consommées permettant le développement de <i>L. monocytogenes</i> , autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales | 100 ufc/g | Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation |
| 1.3 Denrées alimentaires prêtes à être consommées ne permettant pas le développement de <i>L. monocytogenes</i> , autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins | Non détection dans 25 g ^a | Avant que la denrée alimentaire n'ait quitté le contrôle immédiat de l'opérateur qui l'a fabriquée |
| | 100 ufc/g | Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation |

médicales spéciales.

440 ^a Le critère en sortie de production peut être adapté à la condition de le producteur puisse
441 démontrer, à la satisfaction de l'autorité compétente, que *L. monocytogenes* n'est pas capable
442 d'atteindre un niveau de 100 ufc/g au cours de la durée de vie du produit, par exemple par la
443 réalisation de challenge-tests ou d'études de vieillissement.

444 Tableau 2. Schémas de conservation proposés par l'EURL *Lm* lors de la réalisation de tests de
445 provocation (7).

| Etape de la chaîne du froid | Température de stockage (°C) | Durée | |
|--|------------------------------|------------------------|------------------------------|
| | | DLC ≤ 21 jours | DLC > 21 jours |
| Entre la fabrication et la mise en étalage | 8 | 1/3 de la durée de vie | 7 jours |
| Stockage en étalage | 12 | 1/3 de la durée de vie | 1/2 (durée de vie – 7 jours) |
| Conservation chez le consommateur | 12 | 1/3 de la durée de vie | 1/2 (durée de vie – 7 jours) |

446 Légende : DLC, date limite de consommation, EURL *Lm*, laboratoire de référence de l'Union Européenne pour
447 *L. monocytogenes*.