

**PERSISTANCE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*  
DANS LES ATELIERS AGRO-ALIMENTAIRES**

**PERSISTENCE OF *LISTERIA MONOCYTOGENES*  
IN FOOD PROCESSING PLANTS**

par Anaïs OVERNEY<sup>1</sup>

**RÉSUMÉ**

La persistance de *Listeria monocytogenes* sur les surfaces dans les ateliers agro-alimentaires, malgré l'application des opérations de nettoyage & désinfection (N&D), peut être responsable de la contamination de produits alimentaires par simple contact avec une surface contaminée. Dans le but d'optimiser les opérations d'hygiène, des facteurs pouvant influencer la survie de cellules adhérentes de *L. monocytogenes* ont été étudiés par un plan d'expériences fractionnaire : le type de souillure alimentaire, le type de souche de *L. monocytogenes*, le type de matériau de surface, la présence ou non d'une souche de *Pseudomonas* et le scénario de l'opération de N&D. D'après les résultats, seul ce dernier facteur a une influence significative (Tableau 1). Les procédures d'hygiène impactent uniquement la cultivabilité des cellules ; toutefois, le séchage des surfaces permet une optimisation de leur efficacité, d'autant plus lorsqu'il est réalisé quotidiennement (Figures 1 et 2).

**ABSTRACT**

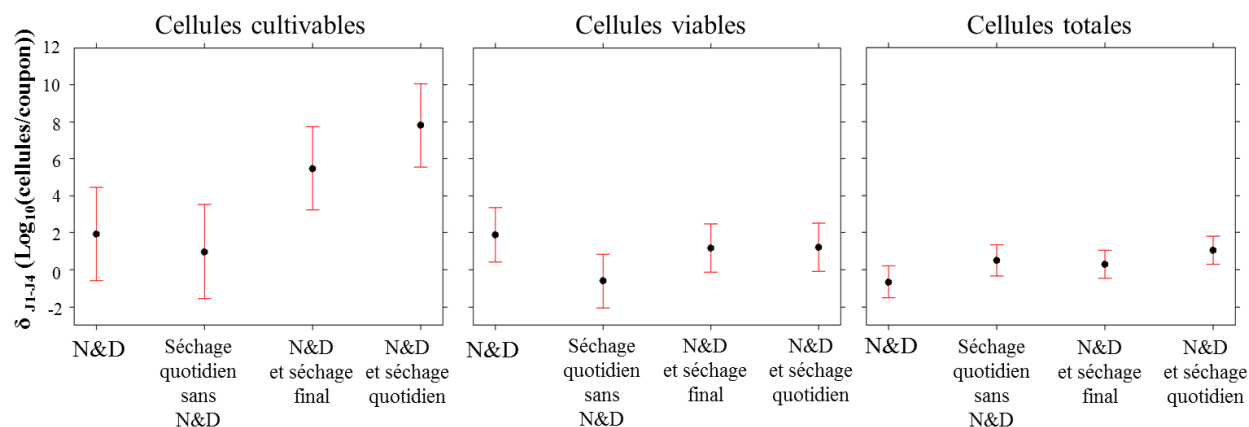
*Despite the application of cleaning & disinfection (C&D), Listeria monocytogenes has the ability to persist on surfaces in food processing plants. Consequently, L. monocytogenes may be responsible for cross-contamination of food through contact with contaminated surfaces. So, optimization of the C&D procedures is necessary.*

*For this purpose, the survival of L. monocytogenes adherent cells subjected to laboratory conditions simulating alternating phases of C&D and production was studied. Several factors that may influence the survival of these cells were considered and combined with a fractional factorial design, including: the food soil, the strain of L. monocytogenes, the surface material, the presence or not of a strain of Pseudomonas, and the scenario of the sanitation procedure. According to the results, the only factor that has a significant influence is the scenario of the sanitation procedure (Table 1). C&D procedures were found to only impact the culturability of adherent cells; however, drying surfaces were found to optimize the effectiveness of the C&D procedures, especially when performed daily (Figures 1 and 2).*

---

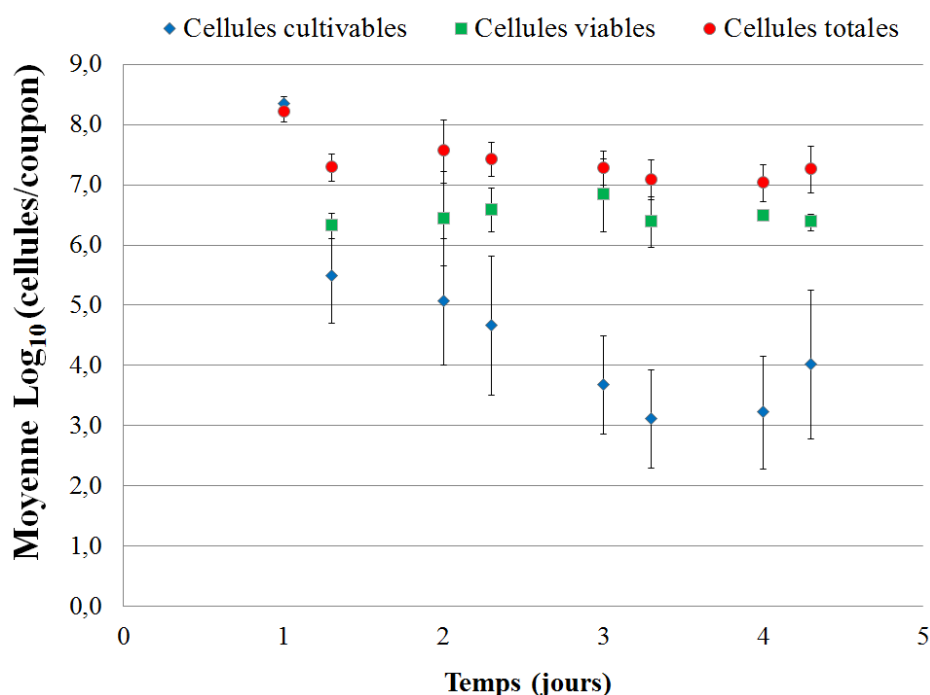
<sup>1</sup> Université Paris-Est (Ecole Doctorale ABIES), Anses, Laboratoire de Sécurité des Aliments, 14 rue Pierre et Marie Curie, 94706 Maisons-Alfort. [anais.overney@gmail.com](mailto:anais.overney@gmail.com).

**NOTE DE RECHERCHE**  
**Présentée par Didier MAJOU, section 8 Alimentation humaine**



**Figure 1 :** Valeurs de  $\delta_{J1-J4}$  pour les cellules cultivables, viables et totales pour chaque scénario d'opération d'hygiène testé. Les barres représentent les intervalles de confiance.

**Figure 1 :**  $\delta_{d1-d4}$  values for culturable, viable and total cells for each tested scenario of sanitation procedure. Bars represent confidence intervals.



**Figure 2 :** Influence des opérations de N&D appliquées quotidiennement durant une semaine avec les produits de N&D dilués au 1/10<sup>ème</sup> sur les cellules de *L. monocytogenes* EGD-e cultivables, viables et totales cultivées à 25°C sur acier inoxydable en présence de jus de saumon fumé. Le seuil de détection des cellules cultivables était de 1,3 log<sub>10</sub>(UFC/coupon) et celui des cellules viables et totales de 4 log<sub>10</sub>(cellules/coupon). Pour les mesures obtenues après les opérations de N&D, les symboles sont

légèrement décalés à droite de ceux obtenus avant N&D ( $n = 6$ , 2 expériences). Les barres représentent les écart-types.

**Figure 2 :** *Influence of daily C&D treatments with C&D products diluted to 1:10 on culturable, viable and total *L. monocytogenes* EGD-e cells cultured on SS with smoked salmon juice. Culturable cells detection threshold  $1.3 \log_{10}(\text{CFU}/\text{coupon})$  and viable/total cells detection threshold  $4 \log_{10}(\text{cells}/\text{coupon})$ . For the measures obtained after C&D treatment, the symbols are slightly to the right of those obtained before C&D treatment ( $n = 6$ , i.e. 2 experiments). Bars represent standard deviation.*

### **A. Nécessité d'optimiser les opérations de nettoyage et désinfection pour mieux lutter contre la persistance de *Listeria monocytogenes***

Dans les ateliers agro-alimentaires, les opérations de nettoyage et désinfection (N&D) sont appliquées quotidiennement pour lutter contre la formation de biofilms sur les surfaces, que ces dernières soient en contact avec les denrées alimentaires ou non. Cependant, la persistance de *L. monocytogenes*, c'est-à-dire sa présence au sein d'un atelier pendant des mois, voire des années malgré l'application correcte et fréquente des opérations d'hygiène, est un problème majeur qui n'est plus à démontrer (Carpentier et Cerf, 2011). Les bactéries persistantes sur les surfaces peuvent se trouver en contact avec des produits alimentaires et les (re)contaminer (Lundén *et al.*, 2002 ; Reij et Den Aantrekker, 2004). Ces denrées, lorsqu'elles sont prêtes à la consommation pour répondre à la demande croissante et aux nouvelles habitudes alimentaires des consommateurs, peuvent alors être responsables de cas de listériose aux conséquences désastreuses pouvant entraîner la mort des malades et des pertes économiques importantes pour les agro-industriels liées à la destruction et au rappel de lots (Donovan, 2015 ; Goulet *et al.*, 2012).

Les biofilms se développent dans les zones humides des ateliers agro-alimentaires, l'eau étant nécessaire à la croissance microbienne. La manipulation de produits alimentaires humides et les procédures de N&D apportent beaucoup d'eau sur les surfaces. Dans la lutte contre la persistance de *L. monocytogenes* dans les environnements agro-alimentaires, le séchage des surfaces après les opérations de N&D, en provoquant un stress hydrique sur les bactéries survivantes, apparaît être une barrière supplémentaire efficace (Bang *et al.*, 2014 ; Zoz *et al.*, 2016). Le concept de l'usine « sèche » reste encore aujourd'hui un vrai challenge pour les industriels. Cependant, une étape de séchage des surfaces permet une réduction des populations microbiennes et/ou limite, au moins temporairement, la croissance des cellules survivantes ainsi que leur circulation dans les ateliers.

De plus, il a été démontré que *L. monocytogenes* pouvait entrer dans l'état viable non cultivable (VNC) sous l'effet des stress rencontrés dans l'environnement (Lindbäck *et al.*, 2010). Cet état physiologique représente un risque potentiel pour les industriels et les consommateurs car les bactéries sont vivantes, mais non détectées, par les méthodes culturales généralement utilisées pour la recherche de *L. monocytogenes* dans un prélèvement de surface, d'où la nécessité d'étudier plus en détail la thématique de la viabilité.

Pour préserver, voire améliorer la sécurité sanitaire des environnements agro-alimentaires vis-à-vis de *L. monocytogenes*, il est primordial d'approfondir les connaissances sur l'adhésion et la persistance de ce pathogène sur les surfaces. Dans ce contexte, un des objectifs était d'étudier l'impact de différents facteurs environnementaux représentatifs des conditions rencontrées dans les environnements agro-alimentaires sur la survie et la persistance de cellules sessiles de *L. monocytogenes* (Overney, 2016).

### ***B. Etude de paramètres influençant la persistance de *Listeria monocytogenes* dans les ateliers agro-alimentaires***

Après avoir mis au point les conditions permettant d'obtenir en laboratoire des populations survivantes de *L. monocytogenes* soumises quotidiennement à des opérations d'hygiène, l'impact de cinq facteurs environnementaux sur la survie et la persistance de ces cellules a été étudié grâce à un plan d'expériences fractionnaire (Kobilinsky *et al.*, 2015 ; Monod *et al.*, 2012). Les facteurs d'intérêt dans le cadre de ce travail étaient les suivants :

- la souche de *L. monocytogenes* : la souche EGD-e (souche plus résistante à la dessiccation) et la souche LO28 (souche moins résistante à la dessiccation) (Zoz *et al.*, 2016),
- le type de matériau de surface : l'acier inoxydable et la céramique,
- la souillure utilisée comme milieu de culture : le jus de saumon fumé et l'exsudat de viande,
- la présence ou non d'une souche favorisant l'adhésion de *L. monocytogenes* : en monoculture ou en co-culture en présence de la souche de *Pseudomonas fluorescens* 09empf87,
- le scénario de l'opération d'hygiène : N&D sans séchage, séchage sans N&D, N&D avec une étape de séchage quotidienne et N&D avec une étape de séchage uniquement en fin de semaine, le séchage étant une étape à 25°C à 75% d'humidité relative pendant 3 heures.

Pour répondre à cet objectif, des cellules adhérentes ont été soumises quotidiennement durant une semaine à une opération d'hygiène (nettoyage avec un alcalin chloré puis désinfection avec un biocide à base d'ammonium quaternaire), puis remises en culture par un dépôt de souillure alimentaire pour simuler en laboratoire l'alternance des procédures de N&D et des phases de production qui ont lieu dans les ateliers agro-alimentaires. Les cellules adhérentes décrochées par traitement aux ultra-sons ont été quantifiées selon leur état physiologique : dénombrement des cellules cultivables par méthode culturale, quantification des populations totales par *polymerase chain reaction* quantitative (PCRq) et quantification des populations viables par PCRq après un traitement au monoazoture de propidium (PMA-PCRq) (Nocker, *et al.*, 2007).

#### **1. Parmi les facteurs testés, seul le scénario de l'opération d'hygiène influence significativement la survie bactérienne**

Pour évaluer l'effet de chaque facteur environnemental testé, nous avons comparé la quantité de cellules décrochées le premier jour (J1) avant l'application de l'opération d'hygiène et le dernier jour de la semaine (J4) après l'application de l'opération d'hygiène, ce qui est traduit par un abattement en logarithme (valeurs  $\delta_{J1-J4}$ ). En d'autres termes, plus l'écart entre la population initiale (J1) et la population finale (J4) est petit, et donc l'abattement faible, plus le facteur environnemental étudié est propice à la survie des cellules de *L. monocytogenes*. Les résultats des analyses statistiques concernant l'impact de chacun des cinq facteurs environnementaux testés sont présentés dans le Tableau 1. Il est considéré que l'impact est significatif quand la valeur *P-value* est inférieure ou égale à 0,05.

Les résultats statistiques indiquaient que seul le scénario de l'opération d'hygiène avait un impact significatif sur les populations de *L. monocytogenes* et ce qu'elles soient totales, viables ou cultivables.

**Tableau 1 :** Résultats statistiques de l'impact de la souche de *L. monocytogenes*, du type de matériau de surface, de la présence ou non d'une souche favorisant l'adhésion de *L. monocytogenes*, du type de souillure alimentaire et du scénario de l'opération d'hygiène sur la survie des cellules *L. monocytogenes* selon leur état physiologique.

**Table 1 :** Statistical results of the impact of *L. monocytogenes* strain, surface material, the presence of a strain enhancing *L. monocytogenes* adhesion, food soil, and scenario of sanitation procedure on the survival of *L. monocytogenes* according to its physiological state.

Facteurs environnementaux	P-value		
	Cellules cultivables	Cellules viables	Cellules totales
<b>Souche de <i>L. monocytogenes</i></b>	0,30	0,23	0,51
<b>Matériau de surface</b>	0,06	0,14	0,10
<b>Présence ou non d'une souche de <i>P. fluorescens</i> favorisant l'adhésion de <i>L. monocytogenes</i></b>	0,08	0,71	0,26
<b>Souillure alimentaire</b>	0,89	0,60	0,13
<b>Scénario de l'opération d'hygiène</b>	0,004	0,02	0,05

## 2. Optimisation des opérations d'hygiène par le séchage des surfaces

L'étape suivante a consisté en la comparaison de chaque scénario de l'opération d'hygiène afin de déterminer le plus efficace pour réduire les populations adhérentes sur les surfaces. Les valeurs de  $\delta_{J1-J4}$  pour chacun des quatre scénarios testés sont présentées dans la Figure 1.

Pour les populations totales et viables, les valeurs de  $\delta_{J1-J4}$  étaient négatives quand le séchage quotidien était appliqué sans traitement de N&D préalable, indiquant que les cellules s'accumulaient sur les surfaces. Ceci n'est pas sans conséquence car l'accumulation de cellules, même mortes, représente une source d'éléments nutritifs et de débris permettant la croissance des cellules vivantes présentes à la surface et l'adhésion potentielle de nouvelles cellules. Le séchage des surfaces par la déshumidification de l'air ne peut donc pas remplacer l'utilisation de produits chimiques de N&D.

Par contre, la procédure de N&D suivie d'une étape de séchage est plus efficace pour diminuer les populations adhérentes que le même traitement de N&D sans étape de séchage. Toutes les valeurs de  $\delta_{J1-J4}$  étaient en effet plus élevées quand le traitement de N&D était suivi d'une étape de séchage (Figure 1). De plus, l'efficacité sur les populations cultivables et viables était

amplifiée quand l'étape de séchage était appliquée quotidiennement après l'opération de N&D plutôt qu'une seule fois à la fin de la semaine. L'étude de Zoz *et al.* (2016) indique que la succession de cycles « déshydratation - réhydratation » engendrait une plus grande diminution de la population microbienne qu'une seule étape de séchage, et ce d'autant plus lorsque la réhydratation est rapide. Il est supposé qu'une réhydratation instantanée induit une entrée rapide d'eau dans les cellules, ce qui conduit à leur mort du fait de la lyse des membranes, alors qu'une réhydratation progressive est plus favorable au maintien de l'intégrité membranaire. Ces éléments pourraient permettre d'expliquer l'impact plus important d'un séchage quotidien en comparaison avec un séchage appliqué uniquement hebdomadairement. En effet, dans le premier cas, les cellules adhérentes subissent plusieurs étapes de séchage après N&D, puis de réhydratation rapide lors de la remise en culture par un dépôt de souillure alimentaire alors que dans le second, les cellules ne subissent qu'une seule fois cette succession d'étapes.

### **3. Les opérations d'hygiène permettent la réduction significative uniquement des cellules cultivables**

L'évolution des populations de *L. monocytogenes* EGD-e adhérentes sur acier inoxydable après application quotidienne des opérations d'hygiène avec les produits de N&D puis remises en culture avec du jus de saumon fumé est présentée dans la Figure 2.

Cet exemple de situation testée dans le cadre du plan d'expériences mentionné précédemment indique qu'avant l'application de la procédure de N&D, les cellules viables étaient toutes cultivables. De plus, une diminution significative a été constatée tout au long de la semaine uniquement pour les populations cultivables ; les populations totales et viables, quant à elles, diminuent seulement d'environ  $1 \log_{10}(\text{cellules/coupon})$  après le premier traitement de N&D et restent ensuite stables les jours suivants, respectivement autour de 7,2 et 6,5  $\log_{10}(\text{cellules/coupon})$  en moyenne. Dès le premier traitement de N&D puis les jours suivants, une différence entre la quantité de cellules viables et celle de cellules cultivables a été mise en évidence, traduisant qu'une fraction de la population était VNC. En accord avec Firmesse *et al.*, 2012, ces résultats indiquent que les opérations de N&D engendrent uniquement une perte de cultivabilité des cellules et représentent un stress qui induit l'apparition de cellules VNC. Par conséquent, le dénombrement des cellules cultivables lors d'un prélèvement de surface n'est pas un critère suffisant pour évaluer la présence potentielle d'une espèce bactérienne Marouani-Gadri *et al.*, 2010. En effet, ce n'est pas parce qu'aucune cellule n'est détectée par les méthodes culturales que la surface est exempte de cellules vivantes et persistantes, cellules potentiellement capables de contaminer des produits alimentaires et de s'y multiplier. Par conséquent, il faut faire particulièrement attention au sentiment de « fausse propreté » que les résultats obtenus après culture sur milieu gélosé peuvent procurer. Cependant, les méthodes culturales sont efficaces dans la mesure où elles permettent, depuis des décennies, de préserver la santé publique. En revanche, pour l'évaluation des risques et les études épidémiologiques, ces méthodes doivent être complétées par les méthodes de biologie moléculaire indépendantes de la cultivabilité des cellules pour un meilleur contrôle des cellules VNC (Ayrapetyan et Oliver, 2016).

### *D. Conclusion*

Les travaux menés nous ont permis de mieux comprendre le comportement de *L. monocytogenes* sur les surfaces dans des conditions rencontrées dans les environnements industriels agro-alimentaires mais souligne la difficulté qu'est de réduire la présence de cellules sessiles persistantes et viables. En effet, les opérations d'hygiène engendrent uniquement une perte de la cultivabilité des cellules et entraînent l'apparition d'une population VNC. Cependant, nos résultats montrent que le séchage des surfaces, par la déshumidification de l'air, permet une optimisation de la procédure de N&D et ce, d'autant plus, lorsqu'il est appliqué quotidiennement comme une étape supplémentaire dans le protocole de N&D.

Les bactéries ont la capacité de s'adapter aux stress rencontrés dans les environnements agro-alimentaires pour y persister en ajustant l'expression de leurs gènes en réponse aux changements des conditions environnementales. Parallèlement aux travaux présentés ci-dessus, des analyses d'expression différentielle des gènes ont été réalisées et ont permis de mettre en évidence la grande diversité des catégories fonctionnelles cellulaires dans lesquelles étaient classés les gènes sur- et sous-exprimés suite à l'application d'un stress (froid, nettoyage, désinfection ou séchage). Ce travail préliminaire ouvre de nombreuses perspectives dont une meilleure compréhension des mécanismes d'adaptation aux conditions environnementales défavorables qui permettent à *L. monocytogenes* de survivre et persister et l'identification de marqueurs de viabilité des cellules pour améliorer leur détection quel que soit leur état physiologique.

### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) AYRAPETYAN, M., and OLIVER, J. D., 2016. – The viable but non-culturable state and its relevance in food safety. *Current Opinion in Microbiology* **8**, 127–133.
- 2) BANG, J., HONG, A., KIM, H., BEUCHAT, L. R., RHEE, M. S., KIM, Y., and RYU, J.-H., 2014. – Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on food-contact surfaces by sequential treatments of aqueous chlorine dioxide and drying. *International Journal of Food Microbiology*, **191**, 129-134.
- 3) CARPENTIER, B., and CERF, O., 2011 – Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, **145**, 1-8.
- 4) DONOVAN, S., 2015. – Listeriosis: a rare but deadly disease. *Clinical Microbiology*, **37**, 135-140.
- 5) FIRMESSE, O., MORELLI, E., VANN, S., and CARPENTIER, B., 2012. – Monitoring of bacterial load in terms of culturable and non-culturable cells on new materials placed in a delicatessen serve over counter. *International Journal of Food Microbiology*, **159**, 179-185.
- 6) GOULET, V., HEBERT, M., HEDBERG, C., LAURENT, E., VAILLANT, V., DE VALK, H., and DESENCLOS, J.-C., 2012. – Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis. *clinical infectious diseases*, **54**, 652-660.
- 7) KOBILINSKY, A., MONOD, H., and BAILEY, R. A., 2015. – Automatic generation of generalised regular factorial designs. <http://vm171.newton.cam.ac.uk/files/preprints/ni15007.pdf>.
- 8) LINDBACK, T., ROTTENBERG, M., ROCHE, S., and RORVIK, L. M., 2010. – The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment. *EDP Sciences*, **41**.
- 9) LUNDEN, J. M., AUTIO, T. J., and KORKEALA, H. J., 2002. – Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. *Journal of Food Protection*, **65**, 1129-1133.

- 10) MAROUANI-GADRI, N., FIRMESSE, O., CHASSAING, D., SANDRIS-NIELSEN, D., ARNEBORG, N., and CARPENTIER, B., 2010. – Potential of *Escherichia coli* O157:H7 to persist and form viable but non-culturable cells on a food-contact surface subjected to cycles of soiling and chemical treatment. *International Journal of Food Microbiology*, **144**, 96-103.
- 11) MONOD, H., BOUVIER, A. and KOBILINSKY, A. 2012. – Construction et randomisation de plans factoriels réguliers avec le package R PLANOR. Paper presented at the 1ères rencontres R., [https://hal.archives-ouvertes.fr/file/index/docid/717556/filename/hmonod\\_Rbordeaux.pdf](https://hal.archives-ouvertes.fr/file/index/docid/717556/filename/hmonod_Rbordeaux.pdf).
- 12) NOCKER, A., SOSSA, K. E., and CAMPER, A. K., 2007. – Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods*, **70**, 252-260.
- 13) OVERNEY, A., 2016. – Persistance de *Listeria monocytogenes* dans les ateliers agro-alimentaires : influence de facteurs environnementaux et étude des mécanismes d'adaptation aux stress. Université Paris-Est. Thèse soutenue le 9 décembre 2016 à Maisons-Alfort. <http://www.theses.fr/s153935#>.
- 14) REIJ, M. W., and DEN AANTREKKER, E. D., 2004. – Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*, **91**, 1-11.
- 15) ZOZ, F., IACONELLI, C., LANG, E., IDDIR, H., GUYOT, S., GRANDVALET, C., GERVAIS, P., and BENEY, L., 2016. – Control of relative air humidity as a potential means to improve hygiene on surfaces: a preliminary approach with *Listeria monocytogenes*. *Plos One*, **11**, 1-14.