



Appel à projets 'Soutien à l'innovation' 2005  
Programme terminé en septembre 2007

## « Application d'outils de gestion de la contamination des saumons et des truites fumés par *Listeria monocytogenes* »

Chef de file : Confédération des Industries de traitement des produits des Pêches Maritimes  
44 rue d'Alésia, 75 682 paris cedex 14  
Contact : Philippe DROIN  
Tel : 01.53.91.44.64, Fax : 01.53.91.44.70 e-mail : [pdroin@adepale.org](mailto:pdroin@adepale.org)

Partenaires : ADRIA NORMANDIE  
ADRIA Développement  
AFSSA LERQAP  
AFSSA LERPPê

### ➤ Situation du sujet et objectifs du projet

Le marché du saumon et de la truite fumé représentait 29800 tonnes en 2006 et est en constante progression (27500 tonnes en 2005). Au vu de cette demande croissante, la filière doit garantir la qualité sanitaire des produits. Des travaux de recherche couplés à l'amélioration des pratiques d'hygiène et de fabrication ont permis de réduire fortement la prévalence de *L. monocytogenes* dans les saumons fumés et en cas de présence, les niveaux de population sont généralement très bas (moins de 1 cellule par gramme). Cependant, en raison d'une prévalence avérée, ce produit, comme d'autres produits sensibles est régulièrement soupçonné en cas de listériose, ce qui nuit fortement à l'image de la filière.

Pour faire face à de telles situations, la filière doit donc être en mesure d'anticiper les risques et avoir une connaissance suffisante des niveaux de contamination, des caractéristiques et profils des souches présentes. Elle doit pour cela disposer d'outils fiables et performants en terme de dénombrement et de typage de *L. monocytogenes*. Sur le plan santé publique, ces informations sont indispensables pour savoir quelles décisions prendre en terme de gestion du risque, non seulement en cas de crise mais pour également les anticiper.

Les objectifs de ce projet concernent l'application d'outils méthodologiques visant à mieux appréhender et gérer le risque de contamination par *Listeria monocytogenes* dans les poissons fumés (saumon et truite). Ces outils correspondent, d'une part, à une méthode de dénombrement des faibles taux et, d'autre part, à la mise en place d'une banque de profils de typage des isolats *L. monocytogenes* permettant à la filière professionnelle, en cas de listériose déclarée, de savoir si les souches impliquées dans des cas humains sont proches ou non des souches issues de la filière.

### ➤ Résultats obtenus

La première partie de ce travail a consisté à valider par des essais inter-laboratoires les méthodes de dénombrement des faibles taux (seuil de détection de 0,2 UFC/g contre 10 UFC/g par les autres méthodes), de sérotypage (par PCR et agglutination) et de typage par électrophorèse en champ pulsé (PFGE).

Afin d'évaluer les performances de la méthode de dénombrement des faibles taux décrite par Gnanou-Besse *et al.* (2004), un essai inter laboratoires (EIL), impliquant 12 laboratoires, a été effectué. Cet EIL contribuera à apporter des données d'inter comparaison en vue d'une normalisation de la méthode par l'AFNOR (Commission Pêches et Produits de la pêche).

Deux méthodes de sérotypage, l'une basée sur les réactions d'agglutination des *Listeria* avec des sérums de lapin (Seeliger, 1979), l'autre basée sur le sérogroupage par PCR utilisant l'amplification de régions spécifiques présentes dans le génome de *L. monocytogenes* (Douthet *et al.*, 2004), ont

été validées par un EIL impliquant 3 laboratoires en charge des aspects analytiques du programme. Les mêmes laboratoires ont réalisé un EIL pour standardiser l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), selon un protocole publié (Graves et Swaminathan, 2001) et adapté de celui proposé par PulseNet. Le protocole de PFGE a été réalisé avec deux enzymes de restriction, *Apal* et *Ascl*.

La deuxième partie du travail a consisté à appliquer les méthodes validées. Pour les aspects de prévalence, la méthode de dénombrement faible taux a été utilisée, parallèlement à l'utilisation d'une méthode de recherche, pour l'analyse de 857 échantillons (702 pour le saumon fumé et 155 pour la truite fumée) provenant de 11 sites différents et durant 4 saisons (été 2006 au printemps 07).

Pour chaque échantillon positif, 3 à 5 isolats ont été mis en collection permettant ainsi la constitution d'une souchothèque. A partir des 857 échantillons analysés au cours de cette étude, 669 isolats ont été congelés (347 isolés en début de conservation et 278 à durée de vie). Quarante-quatre souches isolées de l'environnement ou de matières premières ont également été fournies par les industriels. Au final, 480 isolats ont été caractérisés en sérotypage et pulsotypage (PFGE), dont 328 de saumons fumés, 108 de truites fumées et les 44 souches isolées préalablement par les industriels.

En ce qui concerne le sérotypage, 4 sérogroupes ont été mis en évidence par PCR. La majorité des souches (79%) sont de sérotypes 1/2a (ou 3a) puis les souches se répartissent dans les sérotypes 1/2c ou 3c (17%), 1/2b ou 3b (3%) et sérotype 4b ou 4d ou 4e (1%, uniquement souches environnementales).

En ce qui concerne le pulsotypage, l'utilisation de l'enzyme de restriction *Apal* a conduit à l'obtention de 27 profils différents, l'enzyme *Ascl* en générant 30. La combinaison des résultats obtenus par les deux enzymes, permet de subdiviser les 480 souches en 34 profils combinés *Apal/Ascl*. Sur les 34, 18 ne sont observés que pour une seule souche alors que les 2 plus fréquents sont mis en évidence pour 145 et 139 souches respectivement. De plus, parmi les 34 profils, 27 sont spécifiquement observés pour les souches d'une seule entreprise, alors que 7 profils sont mis en évidence pour des souches de 2 à 6 entreprises. Un seul profil combiné a été mis en évidence pour des souches isolées de truite fumée et de saumon fumé. Les autres profils observés pour les truites ne sont pas mis en évidence pour les souches de saumon. Pour trois entreprises, des souches issues de prélèvements d'environnement ont été analysées. Certains des profils mis en évidence pour ces souches environnementales sont également observés dans les produits.

Enfin, une comparaison des données du projet a été faite avec la banque de données de l'Afssa (base partielle des profils mis en évidence depuis 1997). Les profils fréquemment mis en évidence dans ce projet ont pu être reliés à un profil Afssa correspondant à des produits isolés dans la filière produit de la pêche. En fait, de nombreux profils ont déjà été identifiés lors d'un projet précédent portant sur la prévalence de *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé (programme LmPR mené par l'unité MQR de l'Afssa Lerqap). Cette comparaison a permis de mettre en évidence la persistance de certains clones au sein d'une même entreprise, puisque des souches montrant le même profil qu'en 2007 avaient été isolées en 2001 et 2002. Il faut noter qu'un profil PFGE obtenu pour 73 souches est retrouvé très fréquemment dans la base Afssa et est associé à des origines très diverses.

En conclusion, le programme réalisé a permis de valider et de d'appliquer des méthodologies fines permettant de pérenniser la démarche de veille de la prévalence et d'épidémiologie-surveillance des *Listeria* dans les poissons fumés. La souchothèque et la banque de profils associée ont pour objectif d'être régulièrement incrémentés.

#### ➤ **Valorisation**

L'ensemble des données du programme sera valorisé grâce à une diffusion aux professionnels *via* le site internet d'Adépale (filiale saumon).

Les essais inter-laboratoires concernant l'application de la méthode de dénombrement de *Listeria monocytogenes* à faible taux seront valorisés de deux manières :

- une publication en cours de rédaction « *Evaluation of an enumeration method for Listeria monocytogenes at low contamination levels in cold-smoked salmon*. N. Gnanou Besse, A. Beaufort, S. Rudelle, C. Denis, B. Lombard » sera soumise à la revue scientifique, International Journal of Microbiology

- une normalisation de la méthode pour les poissons fumés sera entreprise dans le cadre de la commission V08B « Pêche et produits de la pêche ».

Les données de typage seront valorisées au travers d'une publication scientifique.