

CARACTERISATION DES CLOSTRIDIIES PSYCHROTROPES RESPONSABLES DE L'ALTERATION DES FOIES GRAS PASTEURISÉS

Stella Planchon, Barbara Nibouche, François Zuber, Stéphane André

Unité EMAIRIT'S, CTCPA, Avenue Clément Ader, 84911 Avignon cedex 9
splanchon@ctcpa.org

RÉSUMÉ

Des clostridies psychrotrophes ont été identifiées dans l'altération des foies gras pasteurisés (FG de canard). Des conditions optimales pour leur croissance (milieu de culture, temps et température) ont été déterminées afin de mieux les isoler en laboratoire et les caractériser par la suite. La caractérisation de ces espèces permettrait de mieux comprendre leur comportement dans les produits depuis leur entrée sur la ligne de transformation jusqu'à la fin de la durée de vie (entre 6 et 36 mois à 4°C). Le deuxième objectif est de déterminer les niches écologiques de ces espèces et la présence éventuelle de points critiques sur une ligne de fabrication.

L'espèce *Clostridium algidicarnis* est aujourd'hui la plus fréquemment rencontrée dans les FG altérés provenant de 7 entreprises depuis 8 années consécutives. La modélisation de la croissance d'une souche de *C. algidicarnis* a permis de déterminer le taux de croissance à 12°C dans la matrice foie gras à l'aide du logiciel Symprevius®.

Ce taux extrapolé à des températures plus basses a montré que sur 36 mois de conservation, aucune croissance n'est constatée à 4°C (pour une concentration initiale de 100 spores/unité de vente) tandis que la croissance démarrerait après 19 et 4,5 mois à 5°C et 6°C, respectivement. La sporulation, laborieuse et non reproductible pour ces espèces, a été obtenue pour quelques souches sur une trentaine étudiée. Un facteur de 5 à 15 a été obtenu entre la thermorésistance en milieu de laboratoire et celle en matrice foie gras pour plusieurs souches de *C. algidicarnis*. Un outil PCR de détection/quantification a été développé pour la mise en évidence du genre *Clostridium* d'une part (amorces décrites dans la littérature), et secondairement de l'espèce *C. algidicarnis* (amorces dessinées à partir de séquences de génomes obtenues dans notre laboratoire). L'étude a été réalisée en milieu de laboratoire, la validation en matrice foie gras sera effectuée prochainement en cours de process et sur les produits finis altérés.

La température est un paramètre important dans la maîtrise de ces flores psychrotrophes. Les résultats de thermorésistance montrent que le traitement de pasteurisation n'est pas suffisant pour éliminer les spores de *C. algidicarnis*. Compte tenu de la fragilité du foie gras, le traitement de pasteurisation ne peut pas être augmenté. Il est donc important de connaître l'origine de la contamination des foies gras par ces espèces et d'identifier les points critiques de développement/sporulation sur les lignes de fabrication.

ABSTRACT

Spoilage of pasteurized foie gras by psychrotrophic clostridia

Psychrotrophic clostridia were identified in spoiled pasteurized Foie Gras (fatty duck liver). Optimal conditions for growth (temperature, medium, time) were selected to allow further study of isolates. Characterization of those species should lead to better understanding of their behavior in food products, from raw material, on transformation lines, up to the end of refrigerated shelf life (3 to 36 months at 4°C). In addition, identification of entry points and growing locations on lines would allow a better control of Critical Points. *Clostridium algidicarnis* is most frequently found in spoiled Foie Gras collected from 7 manufacturers, on 8 years study. Growth modelling with Symprevius® model of one *C. algidicarnis* strain in Foie Gras, provided growing rate at 12°C. Simulation showed that no development occurs at 4°C up to 36 months. However growth starts after 19 and 4.5 months at 5° and 6°C respectively. Difficult and poorly reproducible sporulation was obtained for only several strains among 30. Heat resistance of spores from different *C. algidicarnis* strains was measured 5 to 15 higher in Foie Gras than in laboratory medium.

An Identification / Quantification tool was developed to detect *Clostridium* spp genera (from PCR sequences previously described), then specifically *C. algidicarnis* (from the sequencing of strains isolated in our lab.). Study was performed in laboratory media, and will be extended to Foie Gras during complete process and refrigerated storage up to spoiled products. Temperature is key parameter for the control of psychrotrophic clostridia. Heat resistance data show that usual pasteurization is insufficient to eliminate *C. algidicarnis* spores. Due to Foie Gras heat sensitivity, thermal treatment cannot be increased. Therefore, better understanding of the origin of contamination of Foie Gras with those species, and identification of critical points of growth and sporulation on processing lines, are required.

INTRODUCTION

Le foie gras est un produit fragile qui est pasteurisé dans son emballage étanche entre 60°C et 85°C afin de préserver ses propriétés organoleptiques. Ce produit est ensuite stocké à des températures $\leq 4^\circ\text{C}$ et présente une longue durée de vie microbiologique entre 6 et 36 mois.

Les microorganismes pathogènes n'ont jamais été rencontrés dans ce produit tandis que les bactéries d'altération telles que les bactéries lactiques (Matamoros et al., 2010) et les **clostridies psychrotrophes** ont été identifiées (Prévost et al., 2013). Les bactéries lactiques peuvent être éliminées en maîtrisant les barèmes de pasteurisation appliqués. Les Clostridies peuvent en revanche former des spores qui leur permettraient de résister à ces traitements. Elles sont également souvent impliquées dans l'altération d'autres produits carnés sous vide.

Le but de l'étude est d'améliorer nos connaissances concernant les propriétés phénotypiques et génétiques de ces espèces. De nombreux articles portent sur la détection de 2 espèces principalement retrouvées dans les viandes sous vide : *Clostridium esthereticum* et *Clostridium gasigenes*. La diversité d'espèces ainsi que l'occurrence de ces clostridies psychrotrophes dans les foies gras n'a jamais été étudiée. Concernant leur thermorésistance, quelques articles mentionnent des valeurs pour des clostridies psychrotrophes en milieu de laboratoire mais pas en matrices alimentaires, notamment pas dans le foie gras. Peu de données sont disponibles au niveau génétique, un seul génome de *C. algidicarnis* a été récemment séquencé (2014). Nous avons donc également procédé à du séquençage du génome de 6 souches de clostridies psychrotrophes isolées de foies gras pasteurisés altérés. **Une meilleure connaissance de ces espèces permettrait un meilleur contrôle tout au long de la ligne de fabrication de foies gras pasteurisés (depuis l'éviscération jusqu'à la fin de durée de vie du produit).**

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Analyses de foies gras altérés

Un total de 99 échantillons de foies gras pasteurisés altérés, de différents types (blocs de foie gras sans morceaux, avec morceaux 30% et 50%, foie gras entier), et provenant de 7 entreprises françaises différentes, a été recueilli entre 2007 et 2015. Les foies gras ont été analysés comme suit : une quantité de 10 g de foie gras pasteurisé a été prélevée aseptiquement au centre et aux extrémités de chaque foie gras altéré, suivie d'une dilution au dixième dans de l'eau peptonée tamponnée et homogénéisation 1 min au Stomacher. Des dilutions sérielles de la suspension mère ont été préparées et étalées sur milieu gélosé Viande Foie Sulfite-Réducteur (VFSR). Les boîtes ensemencées ont été incubées à 25°C, en anaérobiose, pendant 5 j pour la mise en évidence des

clostridies psychrotrophes et 12°C pendant 10 j pour les clostridies psychrophiles.

Des colonies noires et blanches ont été prélevées sur les géloses afin de réaliser l'extraction d'ADN avec la méthode Instagen® selon les recommandations du fournisseur (Biorad). Des amorces universelles complémentaires de la région codant l'ARN ribosomal 16S des bactéries ont été utilisées pour réaliser l'amplification (Weisburg W.G. et al., 1991).

L'amplification a été réalisée avec le programme suivant : 3 min à 94 °C et 35 cycles de [40 sec à 94 °C, 40 sec à 55 °C, 1 min à 72°C] suivi d'une étape à 72°C pendant 10 min. La région 16S de l'ADN amplifié a été partiellement séquencée par la société Eurofins. Les séquences d'ADN disponibles en format FASTA ont été insérées dans les bases de données (NCBI Blast et Ribosomal Database Project, RDP) pour identifier les espèces bactériennes.

1.2. Modélisation de la croissance dans le foie gras

Une souche de *C. algidicarnis*, isolée précédemment de foie gras altéré et conservé en cryobilles à -80°C, a été utilisée. Une revivification suivie d'une culture ont été préalablement effectuée en milieu liquide (Rosenow AMC) à 30°C pendant 5 jours et 48h, respectivement. Une inoculation à 10^2 UFC/g d'une souche de *C. algidicarnis* a été réalisée dans la masse de foie gras cuit. Les échantillons inoculés (réplicats techniques pour chaque temps) ont été incubés à 12°C sous vide et prélevés à différents temps pendant 1 mois. La croissance a été mesurée par dénombrement sur VFSRm incubé à 30°C pendant 5j. Une modélisation a été réalisée à l'aide du modèle de Rosso disponible dans le logiciel Symprevius®. Le taux de croissance maximal (μ_{max}) ainsi que le taux de latence (lag) ont été déterminés à partir de cette courbe de croissance.

1.3. Production de spores et mesure de la thermorésistance

Quatre souches de *C. algidicarnis* (N° 3227 013, 3227 034, 3227 038, 3227 043), isolées de foies gras altérés, ont été revivifiées puis cultivées en milieu Rosenow supplémenté avec amidon, marbre, cervelle. Un volume de 0,5 ml de culture a été déposé sur milieu VFSR pour réaliser la sporulation pendant 3 semaines à 30°C. Les spores obtenues ont ensuite été lavées à l'eau stérile avec plusieurs cycles de centrifugations, conservées par lyophilisation, puis remises en suspension dans de l'eau stérile froide juste avant utilisation.

La thermorésistance des spores de différents isolats a été mesurée en tampon phosphate et en mûlée crue pour bloc de foie gras, ionisée (86.2% foie gras tout venant frais, 1,3% sel nitrité, 0.3% poivre, 0.2% sucre et 12% eau). Détermination par la méthode en capillaires de 200 μL immergés des durées précises en bain d'huile à température prédéfinie et contrôlée. La durée de réduction décimale D, définie comme le temps nécessaire pour réduire la population d'un log,

ainsi que la valeur de δ , ont été calculées à partir du modèle de Weibull modifié.

1.4. Développement d'outils moléculaire de détection des clostridies psychrotrophes

Les souches de *Clostridium* spp., de bactéries lactiques, d'entérobactéries et d'autres bactéries pathogènes ou d'altération retrouvées dans le foie gras (*Thermoanaerobacterium*, *Bacillus*...) ont été cultivées en milieu Brain Heart Infusion (BHI). L'ADN a été extrait par la méthode Instagen® selon les recommandations du fournisseur (Biorad). Des amorces ont été conçues à partir de portions spécifiques du gène codant une enzyme de *C. algidicarnis*. La séquence du gène a été obtenue à partir de 3 souches de *C. algidicarnis* séquencées récemment (Planchon et al., données non publiées). L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur CFX96 Real time system (Biorad) avec le programme suivant : 2 min à 98 °C et 40 cycles de [30 sec. à 95 °C, 1 min à 55 °C]. Les données de température de fusion (Melting Temperature), le nombre de cycles nécessaire pour la détection de l'amplification : Ct (cycle threshold) et l'intensité de l'amplification ont été recueillis sous format Excel.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Un total de 99 échantillons de foies gras altérés provenant de 7 entreprises différentes a été recueilli entre 2007 et 2015 (Tableau 1).

Tableau 1 : Les différentes espèces de *Clostridium* spp. isolées de foie gras pasteurisés altérés

Nom des espèces identifiées	Nombre d'échantillons
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	1
<i>Clostridium algidicarnis</i>	26
<i>Clostridium algidicarnis</i> / <i>putrefaciens</i>	28
<i>Clostridium algidixylanolyticum</i>	3
<i>Clostridium aminovalerium</i>	1
<i>Clostridium bifermentans</i>	3
<i>Clostridium bowmanii</i>	3
<i>Clostridium bowmanii</i> / <i>estherteticum</i>	18
<i>Clostridium butyricum</i>	4
<i>Clostridium cochlearium</i>	3
<i>Clostridium frigidicarnis</i>	2
<i>Clostridium intestinale</i>	1
<i>Clostridium manganotii</i>	1
<i>Clostridium sartagoforme</i>	1
<i>Clostridium</i> sp.	
<i>Clostridium sporogenes</i>	1
<i>Clostridium thiosulfatireducens</i>	1
<i>Clostridium xylanolyticum</i>	1
TOTAL	98

Sur les 98 isolats, 26 isolats ont été identifiés comme appartenant à l'espèce *C. algidicarnis*, 28 appartenant à la double espèce *C. algidicarnis/Clostridium putrefaciens*, 3 appartenant à l'espèce *Clostridium bowmanii* et 18 appartenant à la double espèce *Clostridium bowmanii/Clostridium estherteticum*.

La présence de *Clostridium* spp dans des produits pasteurisés peut être liée à une contamination des matières premières puisque que les spores de ces bactéries peuvent survivre à la pasteurisation. Les altérations se décrivent par de fortes odeurs, avec ou sans changement de structure du produit (liquéfaction), avec ou sans noircissement des produits selon l'espèce altérante.

Les 4 espèces *C. algidicarnis/Clostridium putrefaciens* et *Clostridium bowmanii/Clostridium estherteticum* ne sont pas différenciables sur la base de l'ARNr 16S sur les portions séquencées. Nous avons opté pour une différenciation biochimique moins couteuse que le séquençage complet de la séquence codant l'ARNr 16S, et réalisable dans tous laboratoires de microbiologie car cette technique est facile et rapide à mettre en œuvre : Les espèces *C. algidicarnis* et *C. putrefaciens* se différencient par l'absence de croissance à 37°C pour cette dernière. Les espèces *C. bowmanii* et *C. estherteticum* se différencient par l'hydrolyse de l'amidon pour la première espèce.

La différenciation a été réalisée sur les 28 isolats de *C. algidicarnis/C. putrefaciens* et sur 3 isolats de *C. bowmanii/C. estherteticum*.

Tous les isolats appartiennent à l'espèce *C. algidicarnis*, excepté un. Concernant les isolats de *C. bowmanii/C. estherteticum*, tous appartiennent à l'espèce *C. bowmanii*. Les espèces *C. algidicarnis* et *C. putrefaciens* sont considérées comme psychrotrophes car elles se développent jusqu'à 37°C et 30°C, respectivement. Tandis que les espèces *C. bowmanii* et *C. estherteticum* sont psychrophiles car elles ne se développent pas au-delà de 20°C.

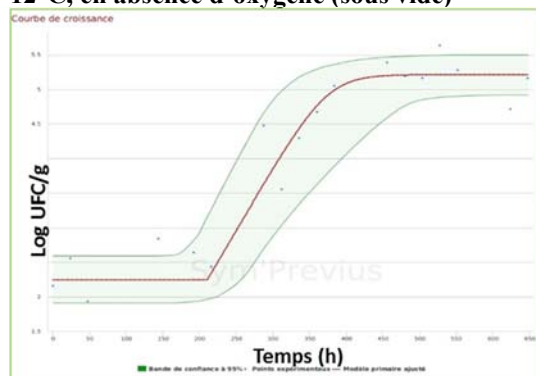
Ces espèces sont plutôt anaérobies strictes avec des tolérances à l'oxygène variables (avec *C. bowmanii* retenue comme la plus sensible à des manipulations en aérobiose). Toutes ces espèces sont donc manipulées en l'absence d'oxygène dans une station anaérobie (DonWhitley). L'espèce *C. bowmanii* est la plus difficile à cultiver et à isoler, la plupart du temps elle a été identifiée à partir d'ADN directement extrait de la matrice alimentaire altérée. Pour cette raison, nous ne disposons que de 3 isolats actuellement.

Cette étude menée sur 8 années, avec la collaboration des entreprises françaises, a permis de déterminer l'espèce majoritairement retrouvée dans l'altération de foies gras pasteurisés.

La croissance d'une souche de *C. algidicarnis* isolée de foie gras altéré a été réalisée sur du foie gras cuit et a permis de déterminer un taux de croissance à 12°C : la phase de latence Lag = 212 heures (8.9 jours) et le taux de croissance maximal $\mu_{max} = 0.04$ logs/heure

(Figure 1). Le taux de croissance détermine la vitesse de croissance du microorganisme. Cela signifie que la croissance de cellules végétatives de *C. algidicarnis* serait de 4 logs en 100 heures à 12°C (4.2 jours) dans du foie gras cuit. Une croissance d'un log (0.96) pourrait se produire sur une journée (24h) à 12°C.

Figure 1. Croissance dans du foie gras pasteurisé de la souche *Clostridium algidicarnis* 3227 009 à 12°C, en absence d'oxygène (sous vide)



Ces données permettent d'estimer le μ_{opt} (taux de croissance optimal à 37°C) grâce au logiciel de microbiologie prévisionnelle Symprevius®, sachant que la température de croissance est comprise entre 4°C et 40°C avec 37°C comme température optimale pour *C. algidicarnis* d'après la littérature. Ce résultat a permis d'extrapoler un taux de croissance optimal à 37°C qui serait de 0.518 logs par heure. La croissance débiterait après un temps de latence de 14.9 h. En 16 h (une nuit), la souche atteindrait une population maximale de 8.3 logs.

L'ensemble des données a ensuite été utilisé pour simuler la croissance de cette souche à basse température : 4, 5 et 6°C. La simulation montre une absence de développement sur 900 jours de conservation à 4°C en partant d'une population de 0.1 spore/g (1 spore/10g) et en considérant qu'elle germe très rapidement. Avec la même population initiale, le taux de 100 ufc/g est légèrement dépassé en 900 j de conservation à 5°C. A la température de 6°C, le taux de 100 ufc/g est atteint en 220 j (7.5 mois) et la population serait de 100 000 ufc/g en 350 jours (11.6 mois).

Ces résultats permettent de mieux expliquer le comportement des clostridies psychrotrophes au stockage réfrigéré dans du foie gras pasteurisé : avec une population de 1 spore/10g, c'est-à-dire 100 spores/kg (pour un échantillon industriel), le dénombrement peut révéler une absence de cellules à T0 c'est-à-dire inférieur au seuil de dénombrement soit 3.3 sp/g (méthode interne CTCPA). Lors de la simulation, le taux de 1000 ufc/g, correspondant au seuil au-dessus duquel on a constaté une altération, est atteint en 8 mois. D'après nos connaissances, ce résultat est souvent observé dans la réalité : les foies gras se révèlent altérés après 8 mois de stockage.

Ces résultats montrent que la température est un facteur très impactant dans le développement de ces flores psychrotrophes.

De nombreux essais de sporulations ont été réalisés sur différents milieux de culture, à différentes températures, en réalisant des combinaisons de conditions entre la préculture et la culture, avec ou sans chocs thermiques, avec ou sans choc oxygène. Cette étude nous a permis d'obtenir des spores pour 4 espèces de *C. algidicarnis*, 1 espèce de *C. estherteticum*, 1 espèce de *C. gasigenes*, et de nombreuses autres espèces de clostridies psychrotrophes (*Clostridium frigidicarnis*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium tertium*...) retrouvées sur des lignes de fabrication de foie gras mais jamais dans les produits pasteurisés altérés. Cependant, une précédente étude a montré que ces 3 espèces citées étaient capables de se développer dans les foies gras ; les industriels doivent donc rester prudents lorsque ces espèces sont identifiées sur leur ligne.

La résistance thermique des lots de spores obtenues pour les différentes espèces a été mesurée par la méthode en capillaires (Tableau 2).

Tableau 2 : Valeurs de thermorésistance D (min) pour 4 souches de *Clostridium algidicarnis* (spores)

Valeurs de D (min)			
Souche	Température	Tampon	
		Phosphate	Foie gras
3 227-038	95°C	4,3	8,2
	90°C	32,8	No destruction
3 227-034	95°C	5,5	21,4
	100°C	< 0,28 (17 sec)	0,9
3 227-013	85°C	12,1	Pas de destruction
	90°C	2,1	30,8
	92,5°C	0,85	17,6
	95°C	< 0,28 (17 sec)	6,6
3227-043	80°C	4,9	Pas de destruction
	85°C	0,99	17,6
	90°C	< 0,28 (17 sec)	2,4
	92,5°C	ND	1,9

Pour la souche de *C. algidicarnis* 3227 013, la valeur de D dans le tampon phosphate se situe entre 12,11 et 0,85 min pour des températures de 85°C à 92,5°C. Dans le foie gras, la valeur de D se situe entre 30,8 et 0,48 min pour des températures de 90°C à 102,5°C. Un facteur 15 est présent entre les valeurs de D à 90°C et 92,5°C et un facteur 32 pour le paramètre δ (du modèle cinétique de Weibull), entre la destruction en tampon phosphate et en matrice foie gras. D'après les différentes valeurs obtenues de D, les valeurs de Z pour le foie gras et tampon phosphate sont équivalentes et sont de l'ordre de 6,4°C et 6,6°C, respectivement.

Pour la souche *C. algidicarnis* 3227 043, le paramètre D déterminé dans le milieu tampon phosphate se situe entre 27,23 min (données non montrées) et 0,99 min pour des températures de 75°C à 85°C. Dans le foie gras, la valeur de D se situe entre 45,57 et 1,91 min pour des températures de 82,5°C min (données non montrées) à 92,5°C. Un facteur 15 existe entre la thermorésistance en matrice et en tampon phosphate à 85 °C et un facteur de 28 pour le paramètre δ . D'après les différentes valeurs obtenues, les valeurs de Z sont proches et sont de 6,9°C en matrice foie gras et 7,1°C en tampon phosphate.

Pour la souche *C. algidicarnis* 3227 034, le paramètre D déterminé dans le milieu tampon phosphate se situe entre 32,8 min et < 17 sec pour des températures de 90°C à 100°C. Dans le foie gras, la valeur de D se situe entre 21,4 min et 0,9 min pour des températures de 95°C à 100°C. Un facteur compris entre 3 et 4 existe entre la thermorésistance en matrice et en tampon phosphate à 85 °C.

Pour la souche *C. algidicarnis* 3227 038, le paramètre D déterminé dans le milieu tampon phosphate est de 4,3 min et 8,2 min dans la matrice foie gras à 95°C. Les résultats de thermorésistance obtenus pour les spores de 4 souches de *C. algidicarnis* ont montrés des valeurs de D assez proches en matrice foie gras à 95°C (entre 6 et 21 min), excepté pour la souche 3227 043 qui présente une valeur de D plus faible (< 1,9 min).

Les résultats de thermorésistance montrent que le traitement industriel usuel de pasteurisation n'est pas suffisant pour éliminer les spores de *C. algidicarnis* dans la matrice foie gras.

Le traitement de pasteurisation ne peut pas être augmenté compte tenu de la fragilité de la matrice foie gras. Il convient donc de pouvoir identifier l'origine de la contamination par les clostridies psychrotrophes sur la ligne de fabrication de foies gras pasteurisés. Une étude est en cours dans notre laboratoire concernant l'écologie de lignes de fabrication de foies gras pasteurisés. Cette étude est réalisée par la méthode de métagénomique en collaboration avec l'université de Liège. Elle sera réalisée dans 3 entreprises françaises.

En parallèle, un outil de détection des clostridies psychrotrophes retrouvées dans le foie gras (Cluster 2) et un autre outil spécifique de *C. algidicarnis* sont en cours de développement au laboratoire.

L'outil permettant la détection/quantification du genre *Clostridium* et utilisant des amorces décrites dans la littérature a été adapté à l'amplification de nos isolats de *Clostridium* spp. psychrotrophes. Les amorces ont été validées avec 6 espèces de *Clostridium* (*C. algidicarnis*, *C. putrefaciens*, *C. bowmanii*, *C. estherteticum*, *C. gasigenes* et *C. frigidicarnis*).

La spécificité a été vérifiée avec 12 genres et 23 espèces différentes, soit un total de 52 souches

susceptibles d'être retrouvés dans les foies gras (entérobactéries, bactéries lactiques et autres). La sensibilité était faible car le seuil de quantification se situait autour de 10^3 CFU/mL et une variabilité de l'efficacité des amorces a été mise en évidence entre les espèces.

La spécificité des amorces utilisées pour la détection/quantification spécifique de *C. algidicarnis* a été validée sur 45 isolats de cette espèce. Elle a également montré l'absence d'amplification vis à vis d'autres clostridies (15 espèces ont été testées) et de 32 souches d'autres bactéries susceptibles d'être retrouvées dans le foie gras. Les essais ont également montré une faible sensibilité des amorces avec un seuil de quantification assez élevé (10^3 CFU/mL).

CONCLUSION

Clostridium algidicarnis est l'espèce la plus fréquemment retrouvée à ce jour dans l'altération des foies gras pasteurisés à longue durée de vie réfrigérée. Les analyses de foies gras altérés continueront à être réalisées afin de suivre l'évolution des espèces de clostridies psychrotrophes dans cette matrice. L'espèce *C. algidicarnis* semble bien adaptée au foie gras car elle se développe relativement facilement (même en présence de sel nitrité).

C. algidicarnis ne peut pas être détruite par traitement de pasteurisation à cause de la thermorésistance élevée des spores. Il est donc nécessaire de contrôler le développement et la sporulation de cette espèce avant le traitement thermique. L'écologie de ligne nous apportera des éléments importants concernant le développement de ces espèces au cours de la transformation de foie gras pasteurisé. Elle nous permettra également d'identifier si des points critiques, favorables à la présence ou au développement ou à l'accumulation de ces espèces, sont présents sur les lignes de fabrication.

Le problème majeur actuel reste le seuil de détection des méthodes d'analyses microbiologiques : la présence d'une seule spore (non détectable à Jo) suffit pour entraîner l'altération d'un foie gras pasteurisé au cours de sa longue durée de vie. Le problème de seuil de détection est aussi valable pour l'outil de détection par biologie moléculaire.

En effet, compte tenu des seuils obtenus dans cette étude, la quantification de *C. algidicarnis* dans les échantillons provenant de l'environnement (les surfaces) et également dans les ingrédients (entrant dans la composition des foies gras comme les épices) dont la concentration en cellules de la cible est généralement faible (autour de 10 CFU/mL), ne pourra pas être déterminée. Une détection pourra seulement être envisagée après enrichissement des échantillons dans un milieu de laboratoire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Matamoros S., S. André, I. Hue, H. Prévost and M. Pilet (2010). Identification of lactic acid bacteria involved in the spoilage of pasteurized “foie gras” products. *Meat science* 85(3): 467-471.

Prevost S., Cayol JL, Zuber F, Tholozan JL, Remize F. (2013). Characterization of clostridial species and sulfite-reducing anaerobes isolated from foie gras with respect to microbial quality and safety. *Food Control* 32: 222-227.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991 Jan; 173(2): 697-703.