

## ÉCOLOGIE MICROBIENNE DE LIGNES DE FABRICATION DE FOIES GRAS DE CANARD PASTEURISÉS

**Stella Planchon\*, Benoît Budzieszewski, Sandra Maisonnas, Barbara Nibouche, Flora Guglielmi, Adeline Catillon, Stéphane André et François Zuber.**

CTCPA ; 449 Avenue Clément Ader, 84911 AVIGNON cedex 9

\*Corresponding author : [splanchon@ctcpa.org](mailto:splanchon@ctcpa.org)

### RÉSUMÉ

L'écologie microbienne de lignes sur trois sites industriels (E1, E2, E3) a été étudiée lors de la fabrication de foie gras bloc avec morceaux pasteurisé. Cette étude a été réalisée par quantification des flores par microbiologie. En parallèle, une semi-quantification (qualification) a été menée par métagénomique globale (Méta 16S) et métagénomique ciblée pour les Clostridies. Les échantillons ont été prélevés par le CTCPA au cours de la transformation du FG pasteurisé : depuis l'éviscération jusqu'au traitement thermique.

Les flores lactiques et les flores anaérobies (inclus les clostridies) sont présentes dès l'entrée des lignes à l'éviscération et comprise entre  $< 10$  et  $10^3$  UFC/g selon l'entreprise. Les flores lactiques et/ou anaérobies se développent ensuite aisément sur lignes de fabrication, notamment au niveau de la cutter, et augmentent jusqu'à une concentration maximale comprise entre 5 et 6 log UFC/g au niveau de l'emboitage pour E2 et E3 mais  $< 5$  log UFC/g pour E1. Le cutterage à 30°C et le temps d'attente consécutif sont des étapes potentiellement à risque sur la ligne de fabrication car les flores se développent fortement et une concentration importante pourrait conduire à une sporulation. Une flore sporulée est détectée avec une occurrence variable mais faible, tout au long de la ligne de fabrication pour E2 et seulement au niveau de la cutter pour l'entreprise E1.

La qualification des flores par métagénomique globale n'a pas permis de détecter les clostridies avant traitement thermique : flores probablement en quantité très minoritaire dans les échantillons (entre 1 à 10 UFC/g), comparées aux bactéries lactiques. Avant traitement thermique, les flores rencontrées sont en entrée de ligne principalement des entérobactéries, remplacées progressivement par des bactéries lactiques : *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*... Après traitement thermique, les clostridies sont détectées par métagénomique globale, ou ciblée, avec comme espèces principales ou apparentées : *C. algidicarnis*, *C. estherteticum*, *C. tagluense*, *C. bowmanii*, *C. frigidicarnis*, *C. sordellii*. Certaines espèces présentent des potentialités d'altération, observées par approche challenge test dans une précédente étude. Ces analyses qualitatives et quantitatives permettent d'avoir une meilleure connaissance et donc une meilleure maîtrise des flores bactériennes en amont et en aval du traitement de pasteurisation, dans le but d'obtenir finalement une meilleure conservation des produits.

### ABSTRACT

#### Microbial ecology of pasteurized duck foie gras processing lines

The microbial ecology of lines at three industrial sites (E1, E2, E3) was studied during the manufacture of pasteurized foie gras block with pieces. This study was carried out by quantifying the flora by microbiology. In parallel, a semi-quantification (qualification) was carried out by global metagenomics (Meta 16S) and targeted metagenomics for *Clostridia*. The samples were taken by the CTCPA during the processing of the pasteurized FG: from evisceration to heat treatment.

Lactic and anaerobic flora (including clostridia) are present at the evisceration step and range from  $< 10$  to  $10^3$  CFU/g depending on the company. The lactic and/or anaerobic flora then easily develop on production lines, particularly at the cutter step, and increase to a maximum concentration of between 5 and 6 log CFU/g at the nesting level for E2 and E3 but  $< 5$  log CFU/g for E1. Cuttering at 30°C and the subsequent waiting time are therefore risky steps on the production line because the flora develop strongly, and a high concentration could lead to sporulation. A sporulated flora is detected with a variable but low occurrence, throughout the production line for E2 and only at the level of the cutter for company E1. The qualification of species by global metagenomics did not allow clostridia detection before heat treatment: flora probably in a very small quantity in the samples (between 1 and 10 CFU/g), compared to lactic acid bacteria. Before thermal treatment, flora encountered are mainly *Enterobacteriaceae* at the beginning of the line, gradually replaced by lactic acid bacteria: *Carnobacterium*, *Pseudomonas fragi*, *Brochotrix thermosphacta*, *Lactobacillus sakei*. After thermal treatment, clostridia are detected by global or targeted metagenomics, with as main or related species: *C. algidicarnis*, *C. estherteticum*, *C. tagluense*, *C. bowmanii*, *C. frigidicarnis*, *C. sordellii*. Some species have alteration potential, observed by challenge test approach in a previous study. These qualitative and quantitative analyses allow a better knowledge and therefore a better control of bacterial flora before and after the pasteurization treatment, with the aim of finally obtaining a better conservation of the products.

## INTRODUCTION

Le foie gras (FG) est produit majoritairement en Europe et plus particulièrement en France, avec 19 190 tonnes en 2012 (Données ITAVI 2013). Il est largement exporté en Union Européenne mais aussi hors UE. Cela représente une part économique importante pour le marché français.

Les flores d'altération des FG pasteurisés sont aujourd'hui bien connues du CTCPA. Au cours de ces dix dernières années, des foies gras de tous types, altérés ou sains, ont été analysés et deux études ont été récemment publiées (Matamoros S., 2010 ; Prévost S., 2013). Parmi les flores d'altération, se trouvent : (i) les clostridies psychrotrophes et (ii) les bactéries lactiques.

La détection de bactéries lactiques dans des produits pasteurisés indique : une recontamination survenue lors d'un reconditionnement post-pasteurisation, ou une perte d'étanchéité de l'emballage ; et/ou un barème de pasteurisation trop faible ; et/ou une augmentation excessive de la contamination de la matière première.

La présence de flores sporulées appartenant au genre *Clostridium* est principalement due à une contamination des matières premières ainsi qu'à leur survie sous forme sporulée (normale et attendue) au traitement de pasteurisation.

L'écologie microbienne de lignes de fabrication de FG n'a pas été étudiée à ce jour. Notre étude (projet collectif ECOFOG) a pour objectifs de répondre aux questions suivantes :

- ✓ Ces flores sont-elles présentes sur le FG dès l'entrée de la ligne de fabrication ?
- ✓ Est-ce qu'elles se développent au cours du process ou est-ce qu'elles restent sous forme sporulée pour les Clostridies ?
- ✓ Quelle est la charge microbienne rencontrée au cours de la transformation du FG pasteurisé, avant le traitement thermique ?
- ✓ Y a-t-il des étapes favorables à leur développement ou à leur accumulation au cours du process ?
- ✓ Les étapes de nettoyage/désinfection des lignes sont-elles efficaces contre ces flores ? (Les résultats du projet 2019 permettront de répondre sur ce dernier point).

Ces différents points permettraient d'acquérir une meilleure connaissance et donc une meilleure maîtrise des flores bactériennes en amont et en aval du traitement de pasteurisation dans le but d'obtenir *in fine* une meilleure conservation des foies gras pasteurisés.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Prélèvements sur ligne de fabrication

Les 3 entreprises partenaires (E1, E2, E3) ont été choisies sur la base de leur volontariat. Les prélèvements ont été réalisés à raison d'une entreprise par an (en période de pleine activité, en décembre). Les entreprises seront comparées pour voir s'il y a des spécificités en terme d'écologie microbienne de ligne, ou au contraire une similarité entre les entreprises.

Les échantillons ont été prélevés par le CTCPA à différentes étapes depuis l'éviscération jusqu'au traitement thermique pour le FG pasteurisé selon le diagramme de fabrication du foie gras de type « bloc avec morceaux » pasteurisé (Figure 1). Avant traitement thermique, les différents prélèvements concernent :

- L'éviscération (E1 et E3),
- La réception des FG cru (Entreprise E2), (l'abattoir n'étant pas sur le même site que la transformation)
- L'éveinage (manuel)
- Le barattage (avec assaisonnements, sous vide et à 4°C)
- Les différents types de FG entrant dans la cutter (FG congelés, stockés, frais, recyclés)
- Le cutterage (émulsion du bloc avec de l'eau chaude et assaisonnement, à 30°C)
- Les morceaux de FG
- L'emboitage (produit fini) : mûlée de FG issu du Cutterage plus les morceaux
- Boîte mère après pasteurisation en autoclave

À chaque étape de prélèvement ci-dessus, trois échantillons (triplicats) ont été prélevés et chaque échantillon est un mélange de plusieurs foies de l'étape concernée.

### 1.2. Analyses microbiologiques

Une quantité de 10 g de foie gras, est prélevée aseptiquement au centre du foie gras en cours de fabrication. Les échantillons ont été dilués au dixième dans de l'eau peptonée tamponnée. Après dilution, chaque sachet a été homogénéisé 1 min au stomacher. Des dilutions sérielles de la suspension mère sont préparées et étalées sur milieux gélosés.

Des dénombrements ont été effectués dans les milieux suivants en conditions d'aérobiose ou anaérobiose suivant les flores :

- (i) Milieu Man, Rogosa et Sharpe (MRS), recommandé pour le dénombrement des bactéries lactiques (en condition aérobiose) ;
- (ii) Milieu Plate Count Agar (PCA), utilisé pour la flore aérobie mésophile totale (en condition aérobiose) ;
- (iii) Milieu Viande Foie Sulfite-Réducteur (VFSR) modifié par ajout de 2g/l d'extrait de levure (en

condition d'anaérobiose), utilisé pour les Anaérobies Sulfite Réducteurs (ASR), et pour les spores de bactéries ASR dénombrées après traitement chimique (méthode interne).

Les dénombrements ont été réalisés après incubation à 25°C et 12°C en anaérobiose pour les bactéries anaérobies et les spores de bactéries anaérobies ; et à 30°C pendant 48 h pour la flore totale et les bactéries lactiques. A l'issue de l'incubation, toutes les colonies ont été dénombrées, et la couleur des colonies (blanches, grises ou noires) a été relevée.

### 1.3. Analyses de métagénomique

Une quantité de 50 g de FG a été utilisé pour réaliser l'extraction d'ADN des flores microbiennes présentes à l'aide du Kit Archive Pure® (GE Healthcare) avec des modifications. La pureté des ADN a été vérifiée par mesure d'absorbance à 230 et 260 nm. Les ADN extraits ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation pour l'amplification.

L'amplification PCR de la région V1- V3 de l'ADN ribosomal 16S a été réalisée par le laboratoire partenaire de l'Université de Liège en utilisant un protocole interne. Deux types de métagénomique ont été réalisées : une métagénomique globale permettant de mettre en évidence l'ensemble des flores et une métagénomique ciblée sur la population des Clostridies. Les résultats sont des abondances relatives correspondant à un nombre de groupement de séquences (OTU = Operational Taxonomic Unit) de l'espèce, du genre ou de la famille identifiée par rapport au nombre total d'OTU dans l'échantillon.

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.1 Quantification des flores au niveau de la ligne de fabrication par microbiologie :

Les flores lactiques et les flores anaérobies (inclus les clostridies) sont présentes dès l'entrée de la ligne à l'éviscération ou à réception (Figure 1).

Les concentrations à l'entrée de la ligne diffèrent légèrement entre les 3 entreprises et sont comprises en moyenne (Figure 2) :

- Entre 10E+01 et 10E+02 UFC/g pour l'entreprise 1,
- De 10E+02 à 10E+03 UFC/g pour l'entreprise 2,
- Entre < 10 et 10E+01 UFC/g pour l'entreprise 3

Pour les entreprises E1 et E3, l'abattoir est sur le même site alors que pour l'entreprise E2, l'abattoir est éloigné de 50 km du site de transformation. Par conséquence, le foie a été analysé à la salle de réception pour l'entreprise E2. Une concentration légèrement plus haute pour l'entreprise 2 est notée et est probablement due à l'effet transport entre le site de l'abattoir et le site de transformation des FG. Cette étape supplémentaire

peut permettre une légère croissance des flores même en conditions de réfrigération.

**Au barattage**, les flores lactique et anaérobies augmentent pour les entreprises 1 et 3 tandis qu'elles stagnent pour l'entreprise E2, seule entreprise pour laquelle les foies n'ont pas pu être prélevés à l'éviscération (Figure 2).

La flore lactique et/ou anaérobie augmente tout au long de la ligne de fabrication. Leur concentration varie entre 3 à < 5 log UFC/g à l'étape de **cutterage - réalisation de l'émulsion de bloc**, pour les entreprises E3 (taux le plus faible) et E1-E2, respectivement (Figures 1 et 2).

Les flores lactiques et anaérobies se développent de façon aisée sur lignes de fabrication, notamment au niveau de la cutter. Le cutterage est une étape favorable au développement des microorganismes notamment par rapport à la température qui se situe autour de 30°C (par ajout d'eau chaude) et compte tenu du temps d'attente qui peut être de 30 min à 2h après cutterage de l'émulsion de FG « chaud », avant traitement thermique. Lors de ces étapes (cutterage et attente avant traitement), les cellules arrivent à des concentrations élevées, la sporulation peut être déclenchée.

**A l'emboitage**, les flores sont comprises entre 5 et 6 log UFC/g excepté pour la flore lactique de l'entreprise E1 qui est inférieure à 4 log UFC/g. Puisque les flores lactiques sont capables de se développer sur le milieu utilisé pour les ASR et en condition d'anaérobiose, pour les entreprises E2 et E3, la flore lactique est égale à la flore anaérobie. En revanche, pour l'entreprise E1, la flore lactique est bien inférieure à la flore anaérobie (3,8 contre 5,1 log UFC/g), le différentiel serait donc de la flore véritablement anaérobie.

Concernant la flore sporulée, aucune spore n'a été détectée dans l'entreprise 1 excepté au niveau de la cutter mais le taux était très faible. Pour l'entreprise 2, la flore sporulée psychrotrophe a été détectée tout au long de la ligne de fabrication avec *Bacillus cereus* comme espèce principale avant et après traitement thermique mais elle n'a pas évolué. Pour l'entreprise 3, la présence de spores anaérobies à 12°C et 25°C est détectée sur 2/3 des échantillons à l'éveinage, au barattage et sur les FG crus stockés 1 jour, entrant dans l'étape de cutterage.

**Après traitement thermique**, toutes les flores analysées pour chacune des 3 entreprises sont inférieures au seuil de dénombrement.

### 2.2 Concernant la qualification des flores par métagénomique :

La métagénomique globale n'a pas permis de détecter les clostridies avant traitement thermique pour deux

des lignes étudiées. Ceci signifie qu'elles sont en quantité très minoritaire dans les échantillons (entre 1 à 10 UFC/g).

Les dénombrements en flores anaérobies correspondraient presque exclusivement à des bactéries lactiques dans certains cas, qui masqueraient les clostridies psychrotrophes.

La flore majoritaire identifiée en entrée de ligne est constituée d'entérobactéries et de bactéries lactiques dans les 3 entreprises étudiées.

Il y a une spécificité d'espèce majoritaire à l'emboitage pour chaque ligne :

- ✓ *Lactobacillus sakei* pour la première ligne,
- ✓ *Carnobacterium divergens* pour la deuxième ligne, et
- ✓ *Lactobacillus curvatus* pour la troisième entreprise.

Les flores lactiques se retrouvent majoritairement avant emboitage mais disparaissent après traitement thermique contrairement aux Clostridies qui persistent après pasteurisation. Ce résultat est cohérent car les bactéries lactiques sont des flores non sporulées thermosensibles et donc détruites par le traitement thermique. Contrairement aux Clostridies qui sont des flores sporulées résistantes au traitement de pasteurisation (Planchon S. et al, unpublished).

La métagénomique ciblée permet de détecter plus spécifiquement les clostridies avant traitement thermique. Des groupes de séquences (OTU) ont présenté des similarités avec les espèces *Clostridium algidicarnis*, *Clostridium frigidicarnis*, *Clostridium estertheticum* et *Clostridium tagluense*, espèce phylogénétiquement proche de *Clostridium bowmanii*. Les résultats montrent une diminution de leur abondance relative lors du procédé de fabrication du foie gras pour la ligne 1 et pour la ligne 2, une présence irrégulière de ces flores empêchant toute conclusion

sur celles-ci pour le moment avec néanmoins une présence plutôt détectée sur des échantillons de matière première stockés réfrigérée (et entrant dans le produit lors du cutterage).

## CONCLUSION

Les résultats du projet ECOFOG montrent que la flore anaérobie et plus précisément l'espèce *Clostridium algidicarnis* proviendrait du foie éviscéré.

*C. algidicarnis* est actuellement la principale cause d'altération des foies gras pasteurisés, hors bactéries lactiques. Elle est responsable de la diminution de la DLC des produits. Elle n'est pas considérée comme pathogène mais les produits altérés sont impropres à la consommation et présentent une forte odeur (Planchon S. et al, unpublished).

Cette espèce présente une thermorésistance assez élevée parmi les spores d'espèces psychrotrophes avec une valeur de D (temps nécessaire pour éliminer un log de la population) à 95°C de 21 minutes pour une souche (Planchon S. et al, unpublished). Elle ne peut donc pas être détruite par la pasteurisation. Il est important d'agir en amont du traitement thermique.

Ces résultats devront être validés pour à terme mettre en place des moyens de maîtrise efficaces, c'est-à-dire ciblés aux bonnes opérations unitaires de ligne.

De plus, des travaux complémentaires vont débiter sur la partie de ligne plus en amont (abattoir) afin de déterminer la prévalence de *C. algidicarnis* sur le FG éviscéré et dans l'environnement d'abattage pour ainsi confirmer ou infirmer l'origine de la contamination.

*Ces travaux ont été réalisés avec l'aide du CIFOG*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Guide des Bonnes Pratiques d'Hygiène relatif à la transformation et au conditionnement du foie gras pasteurisé, appertisé et du magret séché, fumé dans le secteur industriel. (Octobre 2014).

Situation de la production et du marché du foie gras, Source La Dépêche. Données ITAVI et autres (Octobre 2013).

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

Planchon Stella \*, Barbara Nibouche, Grégoire Cordier, Stéphane André, François Zuber. *En cours de publication*. Characterization and detection of *Clostridium algidicarnis* associated with spoilage of pasteurized foie gras.

Prévost S., Cayol J.L., Zuber F., Tholozan J.L., 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.

Figure 1 : Diagramme de fabrication du foie gras pasteurisé

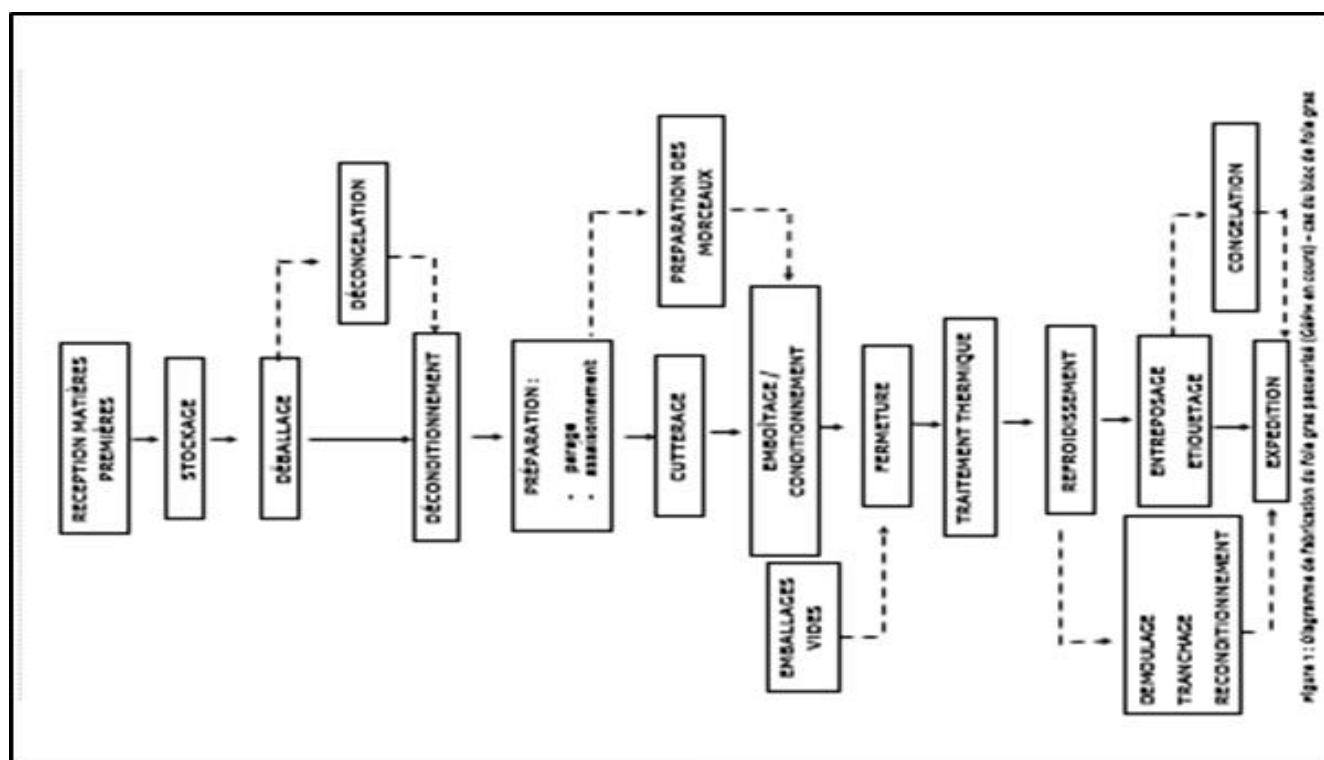


Figure 2. Comparaison des concentrations en flore lactique (BL) et Anaérobies à 12°C (Ana 12) des foies gras, dénombrées à différents points de prélèvement sur ligne, entre les 3 entreprises (E1, E2, E3)

