

La contamination des fourrages par *Listeria monocytogenes* : synthèse des connaissances

C. LAITHIER (1), V. HEUCHEL (2), G. CORROT (3), J.-L. MÉNARD (4)

(1) Institut de l'Élevage, Chambre Régionale d'Agriculture de Normandie, 6 rue des Roquemonts, 14053 Caen

(2) Institut de l'Élevage, 149 rue de Bercy, 75595 Paris cedex 12

(3) Institut de l'Élevage, 9 rue de la Vologne, 54522 Laxou cedex

Institut de l'Élevage, Maison de l'Agriculture, BP 646, 49006 Angers cedex 01

RÉSUMÉ - La contamination par *Listeria monocytogenes* des fourrages conservés, et notamment des fourrages fermentés (balles rondes enrubannées, ensilages), est la première étape de la principale voie de contamination du lait dans les élevages. La faible contamination des fourrages verts en est à l'origine. La fréquence de contamination de l'herbe ou du maïs avant récolte est très variable sans que l'on en connaisse précisément les raisons. Les fourrages fermentés favorisent le développement de *Listeria monocytogenes* s'ils sont réalisés ou conservés dans de mauvaises conditions. La contamination du foin a été observée. Cependant, les données existantes ne permettent pas de comparer les fréquences et les niveaux de contamination respectifs des différents fourrages. Le risque de contamination des fourrages fermentés peut être réduit en respectant les bonnes pratiques de réalisation. Au delà du tri et de la non distribution des couches superficielles du fourrage, des pratiques rigoureuses d'hygiène lors de la traite réduisent considérablement ou éliminent les risques de contamination du lait. Des voies d'amélioration semblent possibles, qui nécessiteraient des recherches complémentaires : mieux connaître la répartition de la contamination dans les silos pour mettre en place une méthode de surveillance de la qualité des ensilages, évaluer les risques liés à la nature des fourrages, étudier l'efficacité des conservateurs, caractériser l'excrétion fécale en lien avec le régime alimentaire.

Listeria monocytogenes contamination of forages : synthesis of knowledge

C. LAITHIER (1), V. HEUCHEL (2), G. CORROT (3), J.-L. MÉNARD (4)

(1) Institut de l'Élevage, Chambre Régionale d'Agriculture de Normandie, 6 rue des Roquemonts, 14053 Caen

SUMMARY - *Listeria monocytogenes* contamination of conserved forages, particularly of fermented forages is the first step of the main way which leads to milk contamination in farms. Low contamination of vegetation gives rise to the contamination of forages. Prevalence of contamination in grass and maize before harvesting is variable for unknown reasons. If fermented forages (silage, big bale silage) are made or conserved in bad conditions, *Listeria monocytogenes* are found in high numbers. Contamination of hay has been observed. Nevertheless, the present studies do not allow comparison of prevalence and level of contamination of these different forages. Risks of contamination in fermented forages can be reduced by making forages with good practices. In addition to removing and discarding superficial areas before feeding, rigorous hygiene practices during milking reduce or eliminate risks of milk contamination. Improvements may be possible which would require other studies : study of the distribution of *Listeria* to establish a method for monitoring the quality of silage, study of the effectiveness of preservatives, characterisation of fecal excretion in relation to diet.

INTRODUCTION

La médiation des récents épisodes de listériose rappelle que la prévention de la contamination des aliments, en particulier des fromages au lait cru, par *Listeria monocytogenes* reste un enjeu majeur pour la santé publique. L'objet de cette synthèse est de faire un état des lieux sur les connaissances relatives à la contamination des fourrages, qui représente le principal facteur de risque de contamination du lait chez le producteur.

1. ECOLOGIE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DANS LES FOURRAGES

1.1. CARACTERISTIQUES GENERALES

Bacille à gram positif, *Listeria monocytogenes* (Lm) ne présente pas de forme sporulée. Une de ses caractéristiques (tableau 1) est de croître à basse température, mais elle est détruite à 60 °C. Elle est capable de survivre, voire de se multiplier à des pH assez bas, dont les seuils dépendent de la température, de la nature et de la concentration de l'acide présent. Ainsi, en se basant sur les valeurs de pH minimum nécessaires pour la croissance de Lm, l'acide acétique est plus inhibiteur que l'acide lactique, qui l'est plus que l'acide citrique (Lou et Yousef, 1999). De très nombreuses interactions antagonistes avec d'autres microorganismes, pouvant être dues à des bactériocines ont été décrites (Larpen, 1995 ; Lou et Yousef, 1999).

Tableau 1
Caractéristiques de croissance de *Listeria monocytogenes*
(Brackett, 1988 ; Larpen, 1995 ; Lou et Yousef, 1999)

	Croissance			Survie	
	Mini	Maxi	Optimum	Mini	Maxi
Température (°C)	1	45	30-37	-18 ^a	60 ^a
pH	5,6-4,4 (à 30°C)	9,6	7-7,5	3,3 ^a	10,0
Oxygène	facultatif		micro-aérophile	b	b
a _w	0,90-0,93 ^b		0,97	0,80	b
NaCl (%)	b		10-12 ^b	0,85	100 ^a

a : survie variable ; b : sans objet

Ces caractéristiques permettent à Lm d'être très répandue dans l'environnement (Brackett, 1988).

1.2. LA VÉGÉTATION : ORIGINE DE LA CONTAMINATION DES FOURRAGES VERTS

Les *Listeria* sont assez fréquemment présentes sur les fourrages verts, en quantité généralement faibles mais très variables, vraisemblablement en fonction des épandages antérieurs aux observations, ou des déjections animales sur les pâtures. La dissémination par des animaux sauvages a été observée (Fenlon, 1985). La végétation est à l'origine de la contamination des sols : *Listeria* fait partie de l'écosystème tellurique (Skovgaard, 1990) et peut y survivre longtemps (Fenlon, 1999).

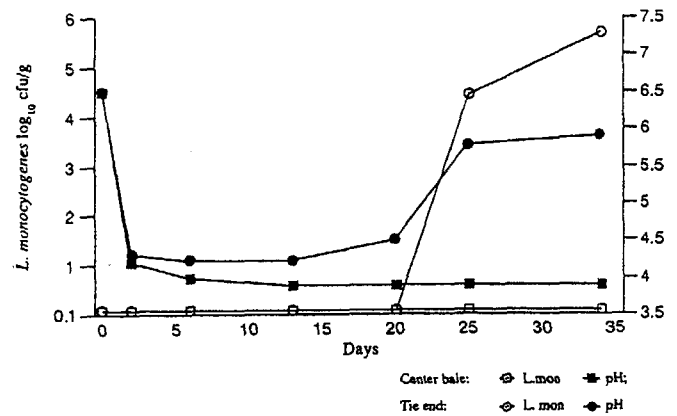
1.3. LE MECANISME DE DÉVELOPPEMENT DE *LISTERIA* DANS LES FOURRAGES FERMENTÉS

Les végétaux une fois coupés, doivent être finement hachés, placés et maintenus en anaérobiose (silos et bâches pour les ensilages, films plastiques pour les balles rondes enrubbannées). En l'absence d'oxygène et grâce aux sucres présents, les fourrages subissent une fermentation lactique qui abaisse le pH jusqu'au pH de stabilité interdisant toute autre fermentation et activité microbienne.

Le développement de Lm dans les fourrages fermentés dépend de l'interaction entre le taux de matière sèche, l'activité de l'eau, le pH et l'oxygénation : d'après Irvin (1968), le pH critique de croissance de Lm dans un milieu d'ensilage d'herbe est de 5,5. La population bactérienne diminue ensuite lorsque se poursuit l'acidification. Celle-ci n'engendre pas forcément

un assainissement complet vis à vis des Lm, qui peuvent alors survivre à des pH bien inférieurs. Si les conditions deviennent favorables, les Lm peuvent croître de nouveau (Fenlon, 1989a). En effet, lorsque la fermeture plastique n'est pas complètement hermétique, l'air diffuse permettant la croissance de bactéries aérobies et de moisissures. Celles-ci, en utilisant l'acide lactique, provoquent une remontée du pH et la croissance des Lm restées vivantes dans l'environnement proche de la source d'air, c'est à dire à la périphérie. Dans le centre de la balle, le pH et le nombre de Lm restent faibles (figure 1).

Figure 1
Effet de l'altération aérobie sur le pH,
la survie et la croissance de *Listeria monocytogenes* dans l'ensilage
(Fenlon, 1989a)



Même avec une acidification menant à un pH de 3,8 dans un fourrage artificiellement contaminé (10⁶ Lm/g), Lm est capable de croître de nouveau au bout de 100 jours de stockage en conditions d'aérobiose. En anaérobiose, un pH de 4,2 est suffisant pour tuer les Lm présentes (Fenlon, 1989a).

Cette altération par l'air paraît accentuée par une faible matière sèche et au contraire diminuée puis stoppée par une dessiccation (70 % de matière sèche). En anaérobiose, en élevant la teneur en matière sèche de 24 % à 46 %, le ralentissement des fermentations prolonge la survie de Lm dans les ensilages d'herbe (Donald *et al*, 1992). A 19 % de matière sèche, la moindre concentration des sucres ne permet pas une acidification suffisante.

L'ensemencement contrôlé d'ensilages d'herbe par d'importantes quantités de bactéries lactiques permet un assainissement en Lm dans des conditions naturelles. Celui-ci peut être total lorsque l'apport artificiel en bactéries pathogènes est élevé (Lafont et Morgan, 1990). L'acidification n'est pas plus importante mais cet inoculum permettrait un démarrage rapide de la fermentation. L'antagonisme non spécifique vis à vis de Lm manifesté par la plupart des bactéries lactiques mésophiles isolées de l'ensilage par Perry et Donnelly (1990) est dû à leur sécrétion d'acide lactique. Aucun antagonisme spécifique (bactériocines) n'a été observé.

2. NIVEAU, FRÉQUENCE, VARIABILITÉ DE CONTAMINATION DES FOURRAGES

Les caractéristiques de développement de *Listeria* expliquent la grande variabilité de contamination observée au sein d'un même fourrage et entre les fourrages (tableau 2). Les résultats doivent cependant être interprétés avec réserve, les méthodes d'échantillonnage ou d'analyse pouvant être très différentes selon les études.

2.1. L'HERBE

Alors que l'herbe sur pied ne contenait pas de Lm (Fenlon *et al*, 1995a), celles-ci étaient présentes sur 9 des 10 échantillons d'herbe fauchée de 24 heures. Les tissus de plante endommagés ou en putréfaction semblent propices à l'isolement de cette bactérie (Weis et Seeliger, 1975). La fertilisation ou l'irrigation par des boues ou des effluents de station d'épuration augmenteraient le risque de contamination (Watkins et Sleath,

1981), de même que les apports directs de terre lors de la récolte. Toutefois, on ne trouve Lm qu'en faible quantité (<50 bactéries/gramme) dans l'herbe coupée et prélevée au niveau des silos (Hartheiser, 1995).

2.2. LES ENSILAGES

On n'a pas observé de différence significative de fréquence de contamination entre les ensilages d'herbe et les ensilages de maïs (Fensterbank *et al*, 1984 ; Sanaa, 1993a).

Les niveaux de contamination des ensilages d'herbe et de maïs dans les silos sont compris entre moins de 50 Lm/g et plus de 10⁶ Lm/g (Sanaa, 1993a ; Hartheiser, 1995 ; Stahl *et al*, 1996). Les Lm peuvent être moins fréquemment isolées de l'ensilage d'herbe que de l'herbe coupée, peut être grâce à l'acidification. Mais certains ensilages d'herbe, contrairement à l'herbe sont fortement contaminés (Hartheiser, 1995 ; étude citée par Corrot *et al*, 1998).

Lm est détectée plus fréquemment dans les ensilages à pH supérieur à 4 - 4,5, même si la bactérie peut être également présente dans les ensilages de bonne qualité présentant un pH inférieur ou égal à 4 (Gronstol, 1979a ; Fenlon, 1985 ; Fensterbank *et al*, 1984 ; Sanaa, 1993a ; Hartheiser, 1995 ; Stahl *et al*, 1996). Dans l'étude de Sanaa (1993a), les isolements réalisés lorsque le pH était inférieur à 4 n'ont été obtenus qu'après enrichissement. Au niveau du silo, les zones périphériques du fourrage en contact avec l'air et susceptibles d'être mal tassées, sont plus souvent contaminées, et en quantité plus importante, que celles du centre du silo (Fenlon, 1986a ; Hartheiser, 1995 ; Sanaa *et al*, 1993 ; Stahl *et al*, 1996).

2.3. LES BALLES RONDEN ENRUBANNÉES (BRE)

Fenlon *et al* (1989b) et Corrot *et al* (1998) indiquent des valeurs de contamination des balles rondes enrubannées comprises entre 35 et plus de 10⁶ Lm/g. Les BRE sont plus souvent contaminées que l'ensilage d'herbe, vraisemblablement du fait d'un pH moyen plus élevé lié à la pénétration d'oxygène plus fréquente surtout en périphérie (Fenlon, 1985 ; Fenlon, 1999). Lm est isolée de 70 % des balles de fourrage jugé altéré (pH =6,6), contre 26 % pour le fourrage jugé sain (pH =4,3) (Fenlon *et al*, 1989b). L'élévation de la teneur en matière sèche est associée à une réduction des zones altérées qui se traduit par une baisse du niveau de contamination des balles. C'est vraisemblablement pourquoi les balles rondes enrubannées examinées en France (50 % de matière sèche) étaient moins contaminées que celles analysées dans le cadre des études de Fenlon (30 % de matière sèche). Le pH modulé par la matière sèche est le critère de base qui conditionne la

destruction, l'inhibition ou le développement de Lm. Dans les balles humides, le pH seuil de multiplication est plus bas que pour les balles plus sèches (Corrot *et al*, 1998).

2.4. LE FOIN

Le foin pourrait être aussi fréquemment contaminé que l'ensilage d'herbe et les balles rondes enrubannées (cité par Corrot *et al*, 1998), peut être parce que le phénomène d'assainissement observé dans les fourrages fermentés ne se produit pas dans le foin. Cette contamination parfois absente ou non détectable (Fenlon *et al*, 1995a) peut toucher jusqu'à 50 % des échantillons (Husu *et al*, 1990a), sans dépasser 100 Lm/g sans doute à cause de la faible teneur en eau disponible au niveau de ce fourrage (Fenlon, 1999).

3. DISCUSSION ET CONCLUSION

La comparaison des souches de Lm isolées dans le lait et l'environnement des élevages confirme l'hypothèse d'un mode prédominant de contamination : les fourrages fermentés contaminés constituent la source primaire ; les animaux qui les consomment excrètent *Listeria* dans leurs fèces, qui contaminent les litières et la peau des trayons ; puis le passage dans le lait s'effectue lors de la traite (Sanaa *et al*, 1993 ; Ménard *et al*, 1998).

Les fourrages fermentés représentent donc un facteur important de risque de contamination du lait par Lm. Ce risque peut être réduit par l'application de mesures préventives appropriées (Sanaa et Ménard, 1994 ; Stahl *et al*, 1996). Elles concernent l'hygiène du troupeau et de la traite et surtout les fourrages : éviter l'incorporation de terre et de bouses, veiller particulièrement au tassement du fourrage et à l'herméticité de la fermeture des silos, reprendre et distribuer le fourrage sans favoriser des reprises de fermentation, éliminer les couches superficielles.

Des recherches complémentaires sont nécessaires pour mieux connaître et maîtriser la contamination des fourrages. Aujourd'hui, les données sont disparates et ne permettent pas de comparer les fréquences et les niveaux de contamination des différentes natures de fourrages fermentés et des fourrages secs. Le pH est un bon indicateur de la qualité de l'ensilage mais on ne peut en connaître l'évolution, les mesures réalisées sur le terrain étant ponctuelles. L'évolution de la contamination en Lm face à une altération aérobie contrôlée a été étudiée en laboratoire. Celle-ci est reliée à l'augmentation du pH et à la croissance des entérobactéries (Fenlon et Wilson, 1998). Ruxton et Gibson, 1995 ont élaboré un modèle mathématique pour visualiser l'effet d'une altération aérobie sur le risque de contami-

Tableau 2
Fréquence de contamination de différents fourrages par *Listeria monocytogenes* (Lm)

Nature du fourrage	Caractéristiques	Nombre prélèvements	% Présence Lm	Référence
Ensilage herbe	Silos tours majoritaires avec acide formique, fermes avec antécédents de listériose-Norvège	291 (113 fermes)	37,1	Gronstol, 1979b
Ensilage herbe	Prélèvements centre du silo-Ecosse	206	2,5	Fenlon, 1985
BRE	Ecosse	27	22	
BRE	1 parcelle	27	70	Fenlon <i>et al</i> , 1989b
Herbe	Prélèvements herbe sur pied, 2 parcelles-Ecosse	30 (1 ferme)	0	Fenlon <i>et al</i> , 1996
Ensilage herbe et maïs	Ensilage d'herbe (26%) ; ensilage de maïs (74%), fermes avec antécédents de listériose-France	65 (33 fermes)	53,8	Fensterbank <i>et al</i> , 1984
Ensilage de maïs	Alsace, France	203	17	Stahl <i>et al</i> , 1996
Ensilage herbe	Centre du silo et passages alimentaires	8 (4 fermes)	0	Husu <i>et al</i> , 1990a
Foin	Balles et couloir d'alimentation-Finlande	8 (4 fermes)	50	
Ensilage herbe	Centre silo (3 prélèvements de novembre à mai)	225 (80 fermes)	16	Husu, 1990b
Herbe pâturée	Herbe fraîchement coupée-Finlande	68 (68 fermes)	38,2	
Herbe	Prélèvements sur 2 campagnes à la récolte	51	39,2	Etude citée par
Ensilage herbe	pour l'herbe ; 6 sites de prélèvement en France	119	7,6	Corrot <i>et al</i> , 1998
BRE	dans des zones avec climats et types d'herbe	206	5,8	
Foin	différents	28	7,1	

nation par Lm suivant la zone considérée de la balle ronde enrubannée. En conditions réelles, il serait intéressant de disposer de références sur la répartition des Lm dans les ensilages au sein du silo et au cours de leur utilisation en complément des travaux de Stahl et al (1996) réalisés de façon locale. Une méthode de surveillance et de contrôle de la qualité des ensilages pourrait alors être mise en place. L'efficacité des conservateurs sur la croissance de Lm mériterait aussi d'être évaluée. Par ailleurs, une meilleure connaissance des caractéristiques (niveau, durée) de l'excrétion fécale par les animaux en relation avec leur régime alimentaire (Husu, 1990 a et b; Fenlon et al, 1996; Low et al, 1995; Skovgaard et al, 1988; Gronstol, 1979a) permettrait d'envisager sa réduction. Ainsi, le risque de contamination du lait pourrait être réduit de même que le risque de contamination des fourrages par recyclage de Lm.

Brackett R.E., 1988. Food Technology, avril 1988, 162-164, 178.
 Corrot G., Champouillon M., Clamen E., 1998. Fourrages, 156, 411-429.
 Donald, A.S., Fenlon, D.R., Seddon B., 1992. In Eigtved's Pakhus, The Eleventh International Symposium on Problems of Listeriosis. Copenhagen, 288-289.
 Fedio W.M., Jackson H., 1992. Dairy Journal, 2, 197-208.
 Fenlon D.R., 1985. J. Appl. Bacteriol., 59, 537-543.
 Fenlon D.R., 1986a. Vet. Rec., 118, 240-242.
 Fenlon D.R., 1986b. Grass Forage Sci., 41, 375-378.
 Fenlon D.R., 1989a. Microbiologie-Aliments-Nutrition, 7, 165-169.
 Fenlon D.R., Wilson J., Weddel J.-R., 1989b. Grass Forage Sci., 44, 97-100.
 Fenlon D.R., Wilson J., Donachie W., 1995a. In Promaco conventions Canning Bridge, Proceedings of the XII International Symposium on Problems of Listeriosis. Perth, Western Australia, 153-156.
 Fenlon D.R., Wilson J., Donachie W., 1996. J. Appl. Bacteriol., 81, 641-650.
 Fenlon D.R., Wilson J., 1998. Grass Forage Sci., 53, 292-295.
 Fenlon D.R., 1999. In Marcel Dekker Inc, *Listeria*, listeriosis and food safety. New York, U.S.A, 21-37.

Fensterbank R., Audurier A., Godu J., Guerrault P., Malo N., 1984. Annales Recherche Vétérinaire, 15, 113-115.
 Gronstol H., 1979a. Acta Vet. Scand., 20, 168-179.
 Gronstol H., 1979b. Acta Vet. Scand., 20, 492-497.
 Hartheiser M., 1995. Quelques observations sur l'évolution de la contamination des ensilages de maïs en *Listeria monocytogenes*. Institut de l'Élevage (non publié).
 Husu J.-R., Seppänen J.T., Sivela S.K., Rauramaa A.L., 1990a. J. Vet. Med., B37, 268-275.
 Husu J.-R., 1990b. J. Vet. Med., B 37, 276-282.
 Irvin A.D., 1968. Vet. Rec., 82, 115-116.
 Lafont P., Morgan P., 1990. Microbiologie-Aliments-Nutrition, 8, 157-163.
 Larpent J.-P., 1995. In Lavoisier Tec&Doc, Les Listeria. Paris, France. 1-25.
 Lou Y., Yousef A.E., 1999. In Marcel Dekker Inc, *Listeria*, listeriosis and food safety. New York, U.S.A, 131-224.
 Low J.-C., Donachie J., Lauchlin M.C., Wright F., 1995. In Promaco conventions Canning Bridge, Proceedings of the XII International Symposium on Problems of Listeriosis. Perth, Western Australia, 141-144.
 Ménard J.-L., Ribaud D., Heuchel V., Zundel E., Pardon P., Audurier M., Audurier A., Verneau D., Pelloquin F., Bernard N., 1998. Réussir la Chèvre, 227, 33-37.
 Perry M.C., Donnelly C.W., 1990. J. Food Prot., 53 (8), 642-647.
 Ruxton J.-D., Gibson G.J., 1995. Grass Forage Sci., 50, 331-344.
 Sanaa M., 1993a. Epidémiologie de la contamination du lait à la ferme par *Listeria monocytogenes*. Thèse de Doctorat de l'université Paris XI. Faculté de médecine Paris-Sud, 207 pages.
 Sanaa M., Poutrel B., Menard J.-L., Serieys F., 1993. J. Dairy Sci., 76, 2891-2898.
 Sanaa M., Menard J.-L., 1994. Rec. Méd. Vet., 170 (6/4), 437-442.
 Stahl V., Garcia E., Hezard B., Fassel C., 1996. Path. Biol., 44 (9), 816-824.
 Skovgaard N., Morgen C.A., 1988. Int. J. Food Microbiol., 6, 229-242.
 Skovgaard N., 1990. Microbiologie-Aliments-Nutrition, 8, 15-20.
 Watkins J., Sleath K.P., 1981. J. Appl. Bacteriol., 50, 1-9.
 Weis J., Seeliger H.P.R., 1975. Appl. Microbiol., 30, 29.