

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE NANTES

- Année 2009 -

**ELABORATION D'UN MODELE EXPERIMENTAL D'ETUDE  
DE LA CONTAMINATION D'ORIGINE DIGESTIVE DE  
SURFACE DES VIANDES - APPLICATION AU DANGER  
CAMPYLOBACTER**

THESE

Pour le diplôme d'Etat  
de  
DOCTEUR VETERINAIRE

Présentée et soutenue publiquement  
le 30 novembre 2009  
devant  
la Faculté de Médecine de Nantes  
par

**Maryne Andrée Catherine-Irène JAÿ**

Née le 19 octobre 1985 à Clamart (Hauts-de-Seine)

**JURY**

Président : Monsieur Pierre LOMBRIL,  
Professeur de Santé Publique à la Faculté de Médecine de Nantes

Membres : Madame Catherine MAGRAS,  
Professeure en Hygiène et Qualité des Aliments à l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Nantes

Madame Christine FOURICHON  
Maître de conférences en Médecine des Animaux d'Elevage à l'Ecole  
Nationale Vétérinaire de Nantes

Invité : Monsieur Michel LAROCHE,  
Chargé de recherches, UMR-INRA 1014 SECALIM, Ecole Nationale  
Vétérinaire de Nantes

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE NANTES

- Année 2009 -

**ELABORATION D'UN MODELE EXPERIMENTAL D'ETUDE  
DE LA CONTAMINATION D'ORIGINE DIGESTIVE DE  
SURFACE DES VIANDES - APPLICATION AU DANGER  
CAMPYLOBACTER**

THESE

Pour le diplôme d'Etat  
de  
DOCTEUR VETERINAIRE

Présentée et soutenue publiquement  
le 30 novembre 2009  
devant  
la Faculté de Médecine de Nantes  
par

**Maryne Andrée Catherine-Irène JAÿ**

Née le 19 octobre 1985 à Clamart (Hauts-de-Seine)

**JURY**

Président : Monsieur Pierre LOMBRAIL,  
Professeur de Santé Publique à la Faculté de Médecine de Nantes

Membres : Madame Catherine MAGRAS,  
Professeure en Hygiène et Qualité des Aliments à l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Nantes

Madame Christine FOURICHON  
Maître de conférences en Médecine des Animaux d'Elevage à l'Ecole  
Nationale Vétérinaire de Nantes

Invité : Monsieur Michel LAROCHE,  
Chargé de recherches, UMR-INRA 1014 SECALIM, Ecole Nationale  
Vétérinaire de Nantes



**CORPS ENSEIGNANT DE L'E.N.V.N.**

Directeur : Pierre SAI (Pr)

<b>DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PATHOLOGIE</b> Patrick Nguyen – Professeur		
NUTRITION et ENDOCRINOLOGIE	Patrick NGUYEN (Pr) Henri DUMON (Pr)	Brigitte SILIART (Pr) Lucile MARTIN (MC)
PHARMACOLOGIE et TOXICOLOGIE	Marc GOGNY (Pr) Martine KAMMERER (Pr) Jean-Dominique PUYT (Pr)	Hervé POULIQUEN (Pr) Jean-Claude DESFONTIS (Pr) Chantal THORIN (PCEA)
PHYSIOLOGIE FONCTIONNELLE, CELLULAIRE et MOLECULAIRE	Lionel MARTIGNAT (MC) Jean-Marie BACH (MC)	Philippe BLANCOU (MC) Julie HERVE (MCC)
ANATOMIE PATHOLOGIQUE	Yan CHERLE (Pr) Jérôme ABADIE (MC)	Frédérique NGUYEN (MC) Marie-Anne COLLE (MC)
PATHOLOGIE GENERALE-MICROBIOLOGIE et IMMUNOLOGIE	Jean-Marc PERSON (Pr) Jean-Louis PELLERIN (Pr)	Hervé SEBBAG (MC) Emmanuelle MOREAU (MC)
LANGUES	Marc BRIDOU (PLEA)	
<b>DEPARTEMENT DE SANTE DES ANIMAUX D'ELEVAGE ET SANTE PUBLIQUE</b> Christine Fourichon – Maître de Conférences		
HYGIENE ET QUALITE DES ALIMENTS	Michel FEDERIGHI (Pr) Bruno LE BIZEC (Pr) Catherine MAGRAS-RESCH (Pr)	Eric DROMIGNY (MC) Marie-France PILET (MC) Jean-Michel CAPPELLIER (MC)
MEDECINE DES ANIMAUX D'ELEVAGE	Arlette LAVAL (Pr) Catherine BELLOC (MC) Isabelle BREYTON (MC)	Alain DOUART (MC) Sébastien ASSIE (MC) Raphaël GUATTEO (MC)
PARASITOLOGIE GENERALE, PARASITOLOGIE DES ANIMAUX DE RENTE, FAUNE SAUVAGE ET PATHOLOGIE AQUACOLE	Monique L'HOSTIS (Pr) Alain CHAUVIN (Pr) Albert AGOULON (MC))	Guillaume BLANC (MC) Ségolène CALVEZ (MC)
MALADIE REGLEMENTEE, ZONOSSES ET REGLEMENTATION SANITAIRE	Jean-Pierre GANIERE (Pr) Suzanne BASTIAN-ORANGE (MC)	Nathalie RUVOEN-CLOUET (MC)
ZOOTECNIE, ECONOMIE	Henri SEEGERS (Pr) Xavier MALHER (Pr) François BEAUDEAU (Pr)	Christine FOURICHON (MC) Nathalie BAREILLE (MC) Marc ROBERT (MC)
<b>DEPARTEMENT DE SCIENCES CLINIQUES</b> Yves Legeay - Professeur		
ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES	Patrick COSTIOU (Pr) Eric BETTI (MC)	Claire DOUART (MC) Claude GUINTARD (MC)
PATHOLOGIE CHIRURGICALE	Olivier GAUTHIER (Pr) Béatrice LIJOUR (MC) Eric AGUADO (MC))	Delphine HOLOPHERNE (MC) Olivier GEFFROY (Pr ) Eric GOYENVALLE (MC)
DERMATOLOGIE, PARASITOLOGIE CARNIVORES, EQUIDES, MYCOLOGIE	Patrick BOURDEAU (Pr)	Vincent BRUET (MCC)
MEDECINE INTERNE ET LEGISLATION PROFESSIONNELLE IMAGERIE MEDICALE	Yves LEGEAY (Pr) Dominique FANUEL (Pr) Anne COUROUCE-MALBLANC (MC) Catherine IBISCH (MC)	Marion FUSELLIER (MC) Jack-Yves DESCHAMPS (MC) Odile SENECA (MC) Cécilia HINDORF (Pr A)
BIOTECHNOLOGIES ET PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION	Daniel TAINTURIER (Pr) Francis FIENI (Pr) Jean-François BRUYAS (Pr)	Lamia BRIAND (MC) Djemil BENCHARIF(MCC)

Pr : Professeur, Pr A : Professeur Associé, Pr I : Professeur Invité, MC : Maître de Conférences, MCC : Maître de Conférences Contractuel, AERC : Assistant d'enseignement et de recherches, PLEA : Professeur Lycée Enseignement Agricole, PCEA : Professeur certifié enseignement agricole.



## Remerciements

**A Monsieur le Professeur Pierre LOMBRIL,**

De la Faculté de Médecine de Nantes,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.  
Hommages respectueux.

**A Madame la Professeure Catherine MAGRAS,**

Professeure en Hygiène et Qualité des Aliments à l'École Nationale Vétérinaire de Nantes

Qui nous a fait l'honneur de nous encadrer et de nous aider au cours de ce travail avec une disponibilité et une gentillesse constante.  
Qu'elle veuille bien accepter le témoignage de notre profonde reconnaissance.

**A Madame Christine FOURICHON,**

Maître de conférences en Médecine des Animaux d'Élevage à l'École Nationale Vétérinaire de Nantes

Pour ses précieux conseils,  
Sincères remerciements.

## Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement **Monsieur Michel LAROCHE**, Chargé de recherches à l'UMR 1014, pour son aide, sa patience, sa gentillesse et sa disponibilité constante, pour avoir donné de son temps, de son humour, de son énergie au laboratoire et derrière l'ordinateur, pour m'avoir écouté et supporté pendant ces huit mois. J'espère que nos chemins se recroiseront et en attendant, je vous souhaite de belles escapades au pays des ours blancs.

Je remercie également **Monsieur Albert ROSSERO**, Ingénieur de Recherches à l'UMR INRA 1014, pour son aide précieuse et sa disponibilité.  
Qu'il soit assuré de notre gratitude.

Merci aussi à **Madame Jeanine FORESTI**, pour ses qualités humaines et son aide. Qu'elle trouve ici l'expression sincère de notre respectueuse gratitude et de notre profond respect.

**A toute l'équipe de l'UMR 1014, et en particulier « les Florences »**, pour leur accueil et leur bonne humeur.

Je remercie aussi **Corinne BOS**, pour sa collaboration.

Enfin, merci à **Manu** pour son appui technique à la réalisation de mes prélèvements.

## Remerciements

### **A mes parents,**

Pour leur soutien et pour l'attention qu'ils ont eue à mon égard tout au long de mes études, pour avoir été à mes côtés contre vents et marées...Je vous dois beaucoup.

Que ces quelques mots soient l'expression de mon infinie reconnaissance.

### **A ma grand-mère,**

Pour avoir toujours trouvé les mots justes.

### **A Gilbus,**

Pour sa constance et son soutien.

### **A Olive et Guillaume,**

Pour ces années partagées et les autres à venir...

A la mémoire de **mes grand-parents.**



# Table des matières

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>19</b>
<b>CONTEXTE.....</b>	<b>21</b>
<b>1 CAMPYLOBACTER THERMOTOLERANT, UN AGENT DE ZOONOSES ALIMENTAIRES LIEES A LA CONSOMMATION DE VIANDE .....</b>	<b>21</b>
<b>1.1 Importance de l'implication des viandes contaminées dans les zoonoses d'origine alimentaire .....</b>	<b>21</b>
1.1.1 Origine alimentaire des zoonoses majeures en Europe .....	21
1.1.2 Les aliments incriminés dans les zoonoses sont des viandes contaminées.....	23
<b>1.2 Campylobacter thermotolérants : des bactéries d'origine digestive .....</b>	<b>24</b>
1.2.1 Caractéristiques biologiques .....	24
1.2.2 Epidémiologie et symptômes chez l'Homme .....	25
<b>1.3 La contamination des viandes lors des différentes étapes de la chaîne alimentaire : modalités du transfert et devenir des bactéries, notamment Campylobacter ...</b>	<b>25</b>
1.3.1 Propositions de définitions .....	25
1.3.1 Modalités de la contamination des carcasses.....	27
<b>2 DEVENIR DES BACTERIES EN SURFACE DES CARCASSES .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Comportement des bactéries sur matrices carnées et conséquences sur l'état de contamination de la denrée.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2 Quelques facteurs de variations du devenir des bactéries sur matrice carnée.....</b>	<b>31</b>
2.2.1 La nature de la surface de contact .....	31
2.2.2 La température .....	34
2.2.3 Le temps de contact .....	34
<b>3. MAITRISE DE LA CONTAMINATION D'ORIGINE DIGESTIVE DES CARCASSES A L'ABATTOIR.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Prévention et/ou décontamination : un débat socio-économique actuel.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Bases du contexte réglementaire français et européen régissant l'hygiène des viandes et leur contamination à l'abattoir.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3 Maîtrise de la contamination d'origine digestive des viandes par une approche préventive et des pratiques raisonnées .....</b>	<b>39</b>
3.3.1 Guides des Bonnes Pratiques d'Hygiène (GBPH), plan Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) et Plan de Maîtrise Sanitaire (PMS).....	39
3.3.2 Les critères microbiologiques .....	42
3.3.3 L'inspection sanitaire des viandes.....	43
<b>3.4 Maîtrise de la contamination d'origine digestive des viandes par des traitements de « décontamination » .....</b>	<b>43</b>
3.4.1 Procédés mécaniques.....	44
3.4.2 Procédés physiques.....	45
3.4.2.1 Immersion, pulvérisation ou rinçage à l'eau chaude .....	45

3.4.2.2 Utilisation de la vapeur .....	48
3.4.2.3 Utilisation de la vapeur suivie d'une aspiration de l'eau ou « steam vacuum » .....	50
3.4.3 Procédés chimiques .....	50
3.4.2 Traitements combinés ou « hurdle technology » .....	54
<b>ETUDE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>57</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>57</b>
<b>1. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>58</b>
<b>1.1 Paramètres de base des deux modèles expérimentaux, .....</b>	<b>58</b>
1.1.1 Choix des souches de <i>Campylobacter</i> .....	58
1.1.1.1 Choix des espèces bactériennes .....	58
1.1.1.2 Choix des souches bactériennes.....	59
1.1.2 Choix des matrices .....	59
1.1.2.1 Matrice viande bovine .....	59
1.1.2.2 Matrice Couenne de porc.....	61
<b>1.2 Fabrication des modèles.....</b>	<b>61</b>
1.2.1 Découpe des matrices carnées .....	61
1.2.2 Modèle « Pénétration » ou « non inclus ».....	62
1.2.3 Modèle « Dispersion » ou « inclus ».....	64
1.2.4 Schéma chronologique général des expérimentations .....	65
<b>1.3 Obtention des inocula de <i>Campylobacter</i> .....</b>	<b>65</b>
1.3.1 Culture <i>in vitro</i> de <i>Campylobacter</i> pour l'obtention des inocula .....	65
1.3.2 Préparation des inocula .....	67
1.3.2.1 Préculture.....	67
1.3.2.2 Quantification des inocula à partir de la préculture : Utilisation de la	
Densité Optique .....	68
1.3.3 Ensemencement des échantillons : inoculation.....	69
1.3.3.1 Temps de contact .....	69
1.3.3.2 Température.....	69
1.3.3.3 Témoins .....	69
<b>1.4 Mode opératoire, notations et chronologie.....</b>	<b>70</b>
1.4.1 Notations.....	70
1.4.2 Chronologie des opérations unitaires.....	71
1.4.3 Détail du mode opératoire d'une expérimentation.....	72
1.4.3.1 Etape 1 : Ensemencement des « matrices préparées », inoculation des	
échantillons .....	72
1.4.3.2 Etape 2 : Mise à l'étuve à 25°C de l'échantillon pendant le délai de	
contact (10 min ou 120 min).....	72
1.4.3.3 Etape 3 : Sortie d'étuve et séparation des trois compartiments à	
dénombrer .....	73
1.4.3.4 Etape 4 : Stomachage de chaque compartiment .....	74
1.4.3.5 Etape 5 : Dilution et ensemencement au terme du stomachage .....	74
1.4.3.6 Etape 6 : Incubation .....	75
1.4.3.7 Etape 7 : Détermination du statut du compartiment et de son niveau de	
contamination : dénombrement des colonies.....	75
<b>1.5 Traitement des données obtenues.....</b>	<b>76</b>

<b>2. RESULTATS</b> .....	<b>78</b>
<b>2.1 Nombre d'échantillons réalisés</b> .....	<b>78</b>
2.1.1 Répartition par modèle .....	78
2.1.2 Contrôle de la température .....	79
2.1.3 Solutions mères .....	79
<b>2.2. Résultats Campylobacter</b> .....	<b>80</b>
2.2.1 Echantillons témoins .....	80
2.2.2 Quantité totale de bactéries récupérées.....	81
2.2.3 Modèle Pénétration .....	82
2.2.4 Modèle Dispersion .....	83
2.2.5 Rendements de récupération.....	84
<b>2.3 Résultats flore totale</b> .....	<b>84</b>
2.3.1 Echantillons témoins .....	84
2.3.2 Quantité totale de bactéries récupérées.....	85
2.3.3 Modèle Pénétration .....	86
2.3.4 Modèle Dispersion .....	87
<b>2.4 Ratios considérés</b> .....	<b>88</b>
2.4.1 Modèle Pénétration .....	88
2.4.1.1 Résultats Campylobacter.....	88
2.4.1.2 Résultats flore totale .....	89
2.4.2 Modèle dispersion.....	89
2.4.2.1 Résultats Campylobacter.....	90
2.4.2.2 Résultats flore totale .....	90
<b>2.5 Facteurs de variation des ratios</b> .....	<b>91</b>
2.5.1 Composition globale de la variance.....	91
2.5.2 Analyse par modèle : modèle Pénétration .....	92
2.5.2.1 Résultats Campylobacter.....	92
2.5.2.2 Résultats flore totale .....	93
2.4.4 Analyse par modèle : modèle Dispersion .....	94
2.4.4.1 Résultats Campylobacter.....	94
2.5.4.2 Résultats flore totale .....	95
<b>3. DISCUSSION</b> .....	<b>98</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>103</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>105</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>115</b>

## Table des figures

Figure 1 : Nombre de cas confirmés et prévalence en nombre de cas par an pour 100 000 habitants des zoonoses rapportées en 2007 dans l'UE constituée alors de 27 Etats membres (43)	22
Figure 2 : <i>Campylobacter spp.</i> en microscopie optique (SECALIM)	24
Figure 3 : Distribution par espèces des isolats de <i>Campylobacter</i> positifs issus de viandes de porcs, de bovins et de volailles (43)	27
Figure 4 : Diagramme simplifié des opérations à risque élevé de contamination primaire pour l'abattage des porcs, des volailles et des gros bovins (hors opérations de contrôles : bien-être animal, traçabilité, inspection sanitaire).	28
Figure 5 : Schéma histologique d'une coupe transversale d'un muscle strié squelettique, d'après(153).	31
Figure 6 : Schéma histologique en coupe du péritoine d'un mammifère, d'après (30).	32
Figure 7 : Schéma histologique de la peau d'un mammifère, d'après (40).	33
Figure 8 : Architecture réglementaire du Paquet Hygiène.	37
Figure 9 : Muscles de la face ventrale du thorax et de l'abdomen du bœuf, d'après(6).	60
Figure 10 : Muscle droit de l'abdomen d'un bovin avant prélèvement	60
Figure 11 : Muscle droit de l'abdomen d'un bovin stocké sous vide	61
Figure 12 : Illustration de la découpe des deux matrices étudiées : couenne et muscle droit de l'abdomen.	62
Figure 13 : Exemple de la découpe de la couche supérieure et inférieure constituant le modèle Pénétration sur matrice Viande.	63
Figure 14 : Illustration de la couche supérieure et inférieure constituant le modèle Pénétration en matrice Couenne.	63
Figure 15 : Inclusion d'un échantillon de couenne dans de l'agar à 2%.	64
Figure 16 : Schéma chronologique des opérations unitaires mises en œuvre lors de notre étude expérimentale.	65
Figure 17 : Etapes pour la constitution d'une banque de cryotubes	67
Figure 18 : Planning hebdomadaire des opérations unitaires constituant deux expérimentations.	68
Figure 19 : Schéma d'organisation des échantillons d'un produit, exemple de matrice Couenne en modèle Dispersion	70
Figure 20 : Etape 1 - Inoculation des échantillons par 100µL d'une solution mère contenant une souche de <i>Campylobacter</i> à l'aide d'une micropipette, selon deux modes « gouttes » ou « étalé »	72
Figure 21 : Etuve réglée à 25°C contenant les solutions mères et les échantillons en attente d'ensemencement et les échantillons ensemencés.	72
Figure 22 : Dépôt du papier en surface de l'échantillon à la fin du temps de contact.	73
Figure 23 : rinçage de l'échantillon et récupération du rinçat à l'aide d'une pipette jetable	73
Figure 24 : séparation du compartiment viande et du compartiment agar et disposition dans un sac stomacher	74
Figure 25 : Stomacher	74
Figure 26 : Une boîte de gélose Karmali ensemencé à l'automate spirale après incubation	75
Figure 27 : Disque de dénombrement utilisé	75
Figure 28 : Box-plots (minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum) représentant la dispersion des résultats de dénombrement pour les inocula de <i>Campylobacter</i> utilisés en fonction de la souche.	79

Figure 29 : résultats de l'électrophorèse en gel des produits de PCR réalisées sur les souches témoins.	80
Figure 30 : Dendrogramme réalisé à partir des résultats de pulsotypage pour les souches isolées sur les témoins et les souches utilisées pour les inoculations.	81
Figure 31 : Box-plot (minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum) représentant la quantité totale de <i>Campylobacter</i> récupérés selon la nature de la matrice et du modèle.	81
Figure 32 : Histogramme des moyennes de la quantité de <i>Campylobacter</i> récupérée selon le compartiment et la matrice en modèle Pénétration.	82
Figure 33 : Histogramme des moyennes de la quantité de <i>Campylobacter</i> récupérée selon le compartiment et la matrice en modèle Dispersion.	83
Figure 34 : Histogramme représentant la moyenne de la quantité de flore totale récupérée sur les trois compartiments des témoins selon la nature de la matrice et du modèle.	85
Figure 35 : Box-plot (minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum) représentant la quantité de <i>Campylobacter</i> totale récupérés selon la nature de la matrice et du modèle.	86
Figure 36 : Histogramme des moyennes de la quantité de flore mésophile totale récupérée selon le compartiment et la matrice en modèle Pénétration.	86
Figure 37 : Histogramme des moyennes de la quantité de bactéries mésophiles détectées selon le compartiment et la matrice en modèle Dispersion.	87
Figure 38 : Valeur des variables calculées (Absorbé, Retenu) pour les campylobacters en fonction des matrices pour le modèle Pénétration.	89
Figure 39 : Valeur des variables calculées (Absorbé, Retenu) pour la flore mésophile totale en fonction des matrices pour le modèle Pénétration.	89
Figure 40 : Valeurs des variables Dispersé, Retenu, et Rinçé calculées pour les campylobacters en fonction des matrices pour le modèle Dispersion	90
Figure 41 : Valeurs des variables Dispersé, Retenu, et Rinçé calculées pour la flore totale en fonction des matrices pour le modèle Dispersion.	91
Figure 42 : Représentation de la participation à la variance de chaque paramètre de variation étudié.	91
Figure 43 : Moyennes de la variable Retenu en fonction des facteurs de variations calculées pour les campylobacters pour le modèle Pénétration.	93
Figure 44 : Moyennes de la variable Retenu en fonction des facteurs de variations calculées pour la flore mésophile totale pour le modèle Pénétration.	93
Figure 45 : Moyennes de la variable Retenu en fonction des facteurs de variations calculées pour les campylobacters pour le modèle Dispersion.	94
Figure 46 : Moyennes de la variable Rinçé en fonction des facteurs de variations calculées pour les campylobacters pour le modèle Dispersion.	95
Figure 47 : Moyennes de la variable Dispersé en fonction des facteurs de variations calculées pour les campylobacters pour le modèle Dispersion.	95
Figure 48 : Moyennes de la variable Retenu en fonction des facteurs de variations calculées pour la flore mésophile totale pour le modèle Dispersion.	96
Figure 49 : Moyennes de la variable Rinçé en fonction des facteurs de variations calculées pour la flore mésophile totale pour le modèle Dispersion.	96
Figure 50 : Moyennes de la variable Dispersé en fonction des facteurs de variations calculées pour la flore mésophile totale pour le modèle Dispersion.	97
Figure A-1 : Jarre	124
Figure A-2 : Variation de température lors de l'élaboration d'un modèle, ici le modèle Dispersion.	129
Figure A-3 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour <i>Campylobacter</i> , matrice Couenne, modèle Pénétration.	136

Figure A-4 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour Campylobacter, matrice Viande, modèle Pénétration.	136
Figure A-5 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour Campylobacter, matrice Séreuse, modèle Pénétration.	136
Figure A-6 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour la flore totale, matrice Couenne, modèle Pénétration.	137
Figure A-7 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour la flore totale, matrice Viande, modèle Pénétration	137
Figure A-8 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour la flore totale, matrice Séreuse, modèle Pénétration	137
Figure A-9 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour Campylobacter, matrice Couenne, modèle Dispersion	138
Figure A-10 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour Campylobacter, matrice Viande, modèle Dispersion	138
Figure A-11 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour Campylobacter, matrice Séreuse, modèle Dispersion	138
Figure A-12 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Rincé pour Campylobacter, matrice Couenne, modèle Dispersion	139
Figure A-13 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Rincé pour Campylobacter, matrice Viande, modèle Dispersion	139
Figure A-14 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Rincé pour Campylobacter, matrice Séreuse, modèle Dispersion	139
Figure A-15 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Dispersé pour Campylobacter, matrice Couenne, modèle Dispersion	140
Figure A-16 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Dispersé pour Campylobacter, matrice Viande, modèle Dispersion	140
Figure A-17 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Dispersé pour Campylobacter, matrice Séreuse, modèle Dispersion	140
Figure A-18 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour la flore totale, matrice Couenne, modèle Dispersion	141
Figure A-19 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour la flore totale, matrice Viande, modèle Dispersion	141
Figure A-20 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour la flore totale, matrice Séreuse, modèle Dispersion	141
Figure A-21 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Rincé pour la flore totale, matrice Couenne, modèle Dispersion	142
Figure A-22 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Rincé pour la flore totale, matrice Viande, modèle Dispersion	142
Figure A-23 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Rincé pour la flore totale, matrice Séreuse, modèle Dispersion	142
Figure A-24 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Dispersé pour la flore totale, matrice Couenne, modèle Dispersion	143
Figure A-25 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Dispersé pour la flore totale, matrice Viande, modèle Dispersion	143
Figure A-26 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Dispersé pour la flore totale, matrice Séreuse, modèle Dispersion	143

## Liste des tableaux

Tableau I : Denrées analysées pour la recherche des principaux agents de zoonoses alimentaires ayant le taux de positivité le plus élevé (d'après le rapport de l'EFSA, 2009)	23
Tableau II : Température optimale de croissance et gamme de croissance (17, 18)	34
Tableaux III : Causes spécifiques d'apparition du danger et mesures de maîtrise, pour des étapes propices à une contamination primaire.	39
Tableau IV : Les 12 étapes de la mise en œuvre de l'HACCP en abattoir.	41
Tableau V : limites critiques et actions correctives du CCP éviscération abdominale (d'après 111)	41
Tableau VI : Critères d'hygiène des procédés pour les viandes et produits à base de viande, d'après le règlement 2073/2005.	42
Tableau VII : Tableau de synthèse d'essais expérimentaux évaluant l'efficacité microbiologique du traitement à l'eau chaude de carcasses ou de parties de carcasses	46
Tableau VII (Suite)	47
Tableau VIII : Tableau de synthèse d'essais expérimentaux évaluant l'efficacité microbiologique du traitement à la vapeur de carcasses ou de parties de carcasses	49
Tableau IX : Tableau de synthèse de sept essais expérimentaux évaluant l'efficacité des traitements chimiques de carcasses ou de parties de carcasses	52
Tableau IX : suite	53
Tableau X : Epaisseurs approximatives des matrices utilisées	62
Tableau XI : Nomenclature des trois compartiments étudiés pour les deux modèles.	64
Tableau XII : Organisation chronologique de la préparation et du traitement des échantillons : unité d'expérimentation	71
Tableau XIII : Seuil de détection en log UFC/mL selon le compartiment et le modèle	76
Tableau XIII : suite	76
Tableaux XIV : Nombre d'échantillons réalisés en fonction du modèle et de la matrice.	78
Tableau XV : Nombre d'échantillons selon la matrice et le modèle par mode d'inoculation et temps de contact	79
Tableau XVI : Moyennes géométriques du rapport entre la quantité de campylobacters inoculée théorique et la quantité totale récupérée.	84
Tableau A-I : Quantité de Campylobacter par matrice et par compartiment pour le modèle Pénétration	131
Tableau A-II : Quantité de bactéries mésophiles par matrice et par compartiment pour le modèle Pénétration.	131
Tableau A-III : Résultats campylobacters pour la Variable Retenu pour le modèle Pénétration	132
Tableau A-IV : Résultats flore mésophile totale pour la Variable Retenu pour le modèle Pénétration	132
Tableau A-V : Quantité de Campylobacter par matrice et par compartiment pour le modèle Dispersion	133
Tableau A-VI : Résultats campylobacters pour les différents variables du modèle Dispersion.	133
Tableau A-VII : Quantité de bactéries mésophiles par matrice et par compartiment pour le modèle Dispersion.	134
Tableau A-VIII : Résultats flore mésophile totale pour les différentes variables du modèle Dispersion	135

## Liste des annexes

<b>Annexe B : BPH, HACCP et critères microbiologiques.</b>	115
B1 Causes générales de contamination et BPH associées (82, 111).	115
B2 : BPH liées au risque de contamination d'origine cutanée.	116
B3 : Les sept principes fondateurs de l'HACCP.	117
B4 : Critères microbiologiques pour les carcasses (chapitre 2, règlement 2073/2005)	118
B5: Tableaux de synthèse des techniques de décontamination des carcasses, des viandes et des produits carnés approuvées par l'USDA.	119
<b>Annexe C : <i>Campylobacter</i></b>	121
C1 : A propos de <i>Campylobacter</i>	121
C2 : Caractères culturels et biochimiques (49, 50)	124
C3 : Composition des milieux utilisés	126
C4 : Techniques de biologie moléculaire utilisées	127
C5 : Température durant les manipulations	129
<b>Annexe D : Données brutes</b>	131
D1 : Statistiques descriptives / modèle Pénétration	131
D2 : Statistiques descriptives / modèle Dispersion	133
D3 - Analyse de variance par produit : modèle Pénétration, variable Retenu	136
D4 - Analyse de variance par produit : modèle Dispersion, flore <i>Campylobacter</i>	138
D5 - Analyse de variance par produit : modèle Dispersion, flore mésophile totale	141

## Liste des Abréviations utilisées

A	Compartiment Agar dans le Modèle Dispersion
AFNOR	Agence Française de Normalisation
AFSSA	Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments
ANOVA	analyse de variance
ASC	chlorite de sodium
B	Compartiment Bas dans le Modèle Pénétration
BPH	Bonnes Pratiques d'Hygiène
C1	<i>C. coli</i> souche CIP 7081
C2	<i>C. coli</i> souche V055
CCP	Critical Control Point, points de maîtrise essentiels
Cd	Matrice Couenne Dispersion (inclus)
CIP	Collection de l'Institut Pasteur
Cp	Matrice Couenne Pénétration (non inclus)
CPC	Cetyl-pyridium chloride
DO	Densité Optique
DOA	Denrées alimentaires d'Origine Animales
EC	étalement à l'ose E, temps court C
EFSA, AESA	European Food Safety Authority, Autorité Européenne de Sécurité des Aliments,
EL	étalement à l'ose E, temps long L
ENITIAA	Ecole Nationale d'Ingénieurs des Techniques des Industries Agricoles et Alimentaires
ENVN	Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes
ESB	Encéphalopathie Spongiforme Bovine
EUFIC	Conseil Européen de l'Information sur l'Alimentation
FMT	flore mésophile totale
GBPH	Guide des Bonnes Pratiques d'Hygiène
GC	étalement gouttes G, temps court C
GL	étalement gouttes G, temps long L
H	Compartiment Haut dans le Modèle Pénétration
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
InVS	Institut de Veille Sanitaire
J1	<i>C.jejuni</i> souche NCTC 11168
J2	<i>C.jejuni</i> souche J049
NASA	National Aeronautics and Space Administration
NCTC	Collection Nationale des Types Cellulaires
NR	Non Renseigné
OGM	Organismes Génétiquement Modifiés
OMS	
P	Compartiment Papier dans le Modèle Pénétration
p	probabilité
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction

Pd Matrice Papier Dispersion (inclus)  
PMS Plan de Maîtrise Sanitaire  
Pp Matrice Papier Pénétration (non inclus)  
R Compartiment Rinçat dans le Modèle Dispersion  
Sd Matrice Viande avec séreuse Dispersion (inclus)  
SECALIM Sécurité des ALiments et Microbiologie  
SHU syndrome hémolytique et urémique  
Sp Matrice Viande avec séreuse Pénétration (non inclus)  
spp. *species*  
T témoin  
TIAC Toxi Infection Alimentaire Collectives  
TSP trisodium phosphate  
UE, EC Union européenne  
UFC Unité Formant Colonie  
USDA-FSIS United States Department of Agriculture – Food Safety and Inspection Service  
V Compartiment Viande dans le Modèle Dispersion  
Vd Matrice Viande sans séreuse Dispersion (inclus)  
Vp Matrice Viande sans séreuse Pénétration (non inclus)  
VTEC *E. coli* verotoxinogène

# Introduction

## Introduction

Le contexte social actuel des pays développés est particulièrement sensible aux problèmes sanitaires comme le montre l'ampleur des crises de l'ESB (Encéphalopathie Spongiforme Bovine), de la listériose, des dioxines, de la mélamine et enfin de la grippe. Or les maladies infectieuses d'origine alimentaire (ou Toxi-Infections Alimentaires, TIA) sont responsables des crises sanitaires les plus fréquentes dans les pays développés. Les denrées d'origine animale y sont souvent montrées du doigt, en particulier les viandes. De fait, en France de 1996 à 2005, parmi les 73% de TIA déclarées pour lesquelles les aliments incriminés ont été identifiés, les viandes dites de boucherie (bovines, porcines notamment) sont responsables de 18,2% de ces TIA, ce qui les place en deuxième position derrière les œufs et les ovoproduits. La contamination en surface de ces viandes par des dangers bactériens présents dans le contenu digestif des animaux en est souvent la cause principale.

Parmi ces dangers bactériens dont le réservoir digestif animal est très développé, *Campylobacter* thermotolérant est aujourd'hui à l'origine de la zoonose bactérienne alimentaire la plus fréquente en Europe. Les modalités de la contamination, c'est-à-dire du transfert et du statut de contamination des viandes vis-à-vis de cette bactérie sont connues et l'étape de la chaîne de production pour laquelle le risque de contamination est le plus élevé est identifiée : il s'agit des opérations unitaires conduisant à l'éviscération abdominale des animaux lors de l'abattage. La présence de *Campylobacter* sur des carcasses peut donc être considérée comme un témoin d'une contamination d'origine digestive.

Des mesures préventives comme l'inspection des viandes à l'abattoir et les Bonnes Pratiques d'Hygiène permettent de maîtriser la contamination des viandes. Néanmoins lorsque celle-ci n'a pu être empêchée, des mesures correctives sont appliquées. Ces mesures s'organisent autour de deux principes de base : le retrait de la consommation humaine de toute ou partie de la viande contaminée, le retrait après un parage en est l'exemple ; la « décontamination » des denrées par différents traitements. En Europe, les traitements de « décontamination » de nature chimique sont interdits. Des traitements mécaniques tels que le parage et le douchage à l'eau à température ambiante sont en revanche observés. Or peu de données sont disponibles sur les effets et les facteurs de variation de ces méthodes correctives simples que sont le parage et le douchage sur le comportement des dangers bactériens, notamment *Campylobacter* thermotolérant, en surface des carcasses (mobilité, dispersion, pénétration). Il semble pourtant que ce comportement puisse varier en fonction de nombreux paramètres dont la nature de la matrice carnée.

Dans ce contexte, l'apport de nouvelles données scientifiques sur le comportement des bactéries ainsi déposées en surface des carcasses et les conséquences d'un rinçage à l'eau de la surface contaminée nécessite une première approche expérimentale. Notre étude a donc eu pour objectifs :

- à partir d'une étude bibliographique de définir la notion de contamination d'origine digestive des viandes, les mesures préventives et correctives de cette contamination. Ces thèmes seront abordés dans la première partie de ce manuscrit où nous aborderons également des éléments du contexte socio-économiques.
- d'élaborer un modèle expérimental d'évaluation de la pénétration en profondeur de la matrice carnée par *Campylobacter* et des conséquences d'un rinçage à l'eau d'une surface contaminée. Ces travaux expérimentaux seront développés en seconde partie de ce manuscrit où après une présentation du matériel et des méthodes, les résultats seront présentés et discutés

Contexte

# 1 *Campylobacter* thermotolérant, un agent de zoonoses alimentaires liées à la consommation de viande

Les zoonoses (du grec *zôon*, être vivant et *nosos*, maladie) sont des maladies, infections (bactéries, virus, prions) ou infestations (parasites protozoaires ou métazoaires) provoquée par des agents transmissibles qui ne sont pas inféodés à un seul hôte et qui peuvent provoquer une infection ou une infestation (avec ou sans signes cliniques) chez au moins deux espèces de vertébrés dont l'Homme (OMS, 1999). Les animaux jouent un rôle majeur dans l'origine de ces zoonoses soit comme vecteur, soit comme réservoir d'agents pathogènes pour l'Homme.

Certains de ces agents zoonotiques constituent une véritable préoccupation de santé publique, à cause de leur agressivité et/ou de leur capacité de diffusion. Une trentaine d'espèces bactériennes et à peu près autant de familles de virus font ainsi l'objet d'une surveillance attentive. En dehors de ces pathogènes majeurs, il faut bien garder à l'esprit que sur les 1415 agents pathogènes recensés chez l'Homme, 61 % sont d'origine animale (32). Ces chiffres donnent une idée de l'ampleur de la « pression zoonotique » qui s'exerce potentiellement sur l'Homme. Au sein de la grande diversité des agents zoonotiques, seuls certains agents présentent véritablement un risque élevé.

L'importance des zoonoses est aussi économique : lorsqu'elles touchent les filières de productions animales, notamment la filière viande, elles ont un impact sur la consommation et les échanges. Etant donnée leur diversité et leur nombre, les agents zoonotiques n'ont pas tous le même impact et l'importance de chacun doit être pondérée par, leur prévalence (nombre de cas sur la population à risque), la gravité de la maladie chez l'Homme, le risque d'amplification par contagion interhumaine, la nature et la grandeur des populations-cibles, l'extension géographique, le coût de la prévention, de la surveillance épidémiologique et de l'impact sociétal (notamment application du principe de précaution)...

La transmission des agents zoonotiques s'effectue selon des modalités nombreuses et variées : contact direct, aérosols, contacts avec des arthropodes vecteurs, consommation de Denrées alimentaires d'Origine Animales (DOA) contaminées... Les zoonoses contractées par voie alimentaire, c'est-à-dire induite par la consommation d'aliments d'origine animale contaminés par un danger dont l'animal était la source, occupent une place particulière. En effet, ces dangers sont souvent associés à un portage inapparent et sont donc indécélables sur l'animal vivant c'est-à-dire *ante mortem*. La sécurité microbiologique et chimique des aliments (résidus et contaminants) compte donc parmi les toutes premières préoccupations actuelles des consommateurs des pays développés, et ce depuis les grandes crises alimentaires qui ont marqué les vingt dernières années (poulet à la dioxine 1999, Encéphalopathie Spongiforme Bovine 1986-2000). Elles font l'objet de mesures de surveillance de plus en plus développées. Les viandes contaminées occupent une place particulièrement importante en Europe dans la transmission de ces zoonoses, comme nous allons le montrer.

## 1.1 Importance de l'implication des viandes contaminées dans les zoonoses d'origine alimentaire

### 1.1.1 Origine alimentaire des zoonoses majeures en Europe

La sécurité alimentaire est au premier plan des préoccupations de santé publique européennes. Ces dernières années, avec la création du Paquet Hygiène, la communauté européenne a mis en place un cadre réglementaire pour tenter de palier aux déficits dont souffrait la législation concernant nos chaînes de productions alimentaires. Elle a également renforcé la surveillance des agents zoonotiques principaux avec la directive 2003/99/EC, demandant à chaque état membre de rechercher, recenser et de notifier la fréquence des zoonoses alimentaires, notamment vis-à-vis de certains dangers précis.

Ainsi le rapport de l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (European Food Safety Authority ou EFSA) paru en janvier 2009 sur les tendances, les sources et les agents de zoonoses, montre que les cinq premières zoonoses en taux d'incidence (figure 1) en Europe sont d'origine alimentaire. Il s'agit respectivement, par ordre décroissant de fréquence, de la campylobactériose, de la salmonellose, de la yersiniose, de l'infection à *E. coli* verotoxinogène (VTEC) et de la listériose, toutes liées à un agent pathogène bactérien (43). Parmi ces cinq premiers agents bactériens zoonotiques, *Campylobacter* est à l'origine du plus grand nombre de cas : 200 507 cas confirmés, soit 45 cas pour 100 000 habitants dans l'UE, constituée alors de 27 Etats Membres en 2007 (43).

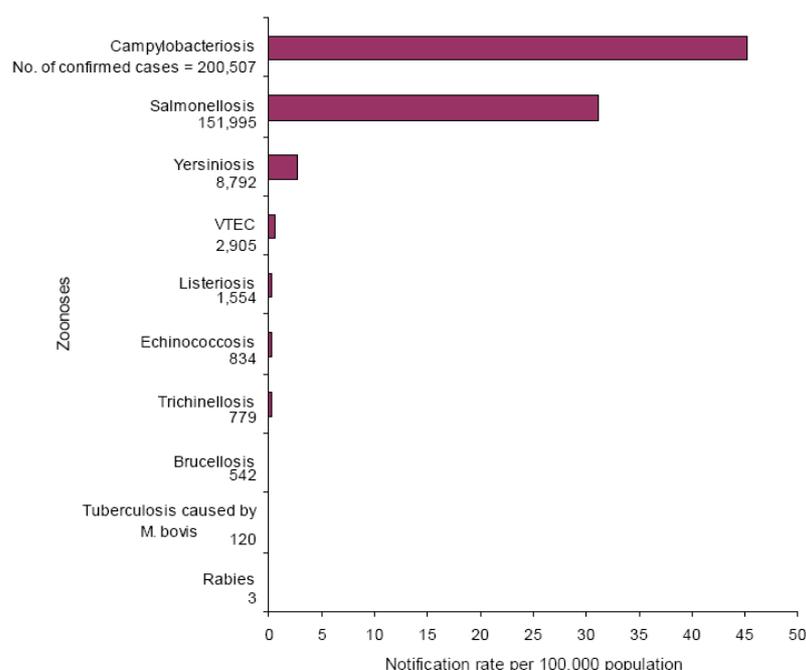


Figure 1 : Nombre de cas confirmés et prévalence en nombre de cas par an pour 100 000 habitants des zoonoses rapportées en 2007 dans l'UE constituée alors de 27 Etats membres (43)

Depuis trois années, les *Campylobacter* thermotolérants sont les premiers agents bactériens en Europe responsables de gastroentérites humaines (EFSA, 2007). Le nombre de cas rapportés est passé de 175 561 en 2006 à 200 507 en 2007. Dans les pays développés (USA, Canada...), *Campylobacter* est l'un des principaux agents bactériens responsables de diarrhée et d'entérite d'origine alimentaire chez l'Homme (74). La campylobactériose serait responsable de 5 à 14 % des cas de diarrhées dans le monde (9). Les campylobactérioses sont des maladies dont l'importance n'a été découverte que récemment car les campylobactéries sont difficiles à cultiver et donc à mettre en évidence. Au fur et à mesure du perfectionnement des méthodes de culture et d'isolement, le nombre de cas recensés a augmenté, dépassant rapidement le nombre de cas liés aux salmonelles.

De façon générale, les maladies infectieuses d'origine alimentaire se manifestent le plus souvent par une symptomatologie digestive mais également par des syndromes sévères et parfois mortels tels que la méningo-encéphalite à *Listeria monocytogenes* ou le syndrome hémolytique et urémique (SHU) consécutif à l'ingestion d'*E. coli* vérotoxino-gènes (155). L'importance de ces zoonoses alimentaires ne tient donc pas uniquement au nombre de cas rapportés. La gravité des symptômes chez l'Homme et le niveau d'exposition au risque doivent être pris en compte. Pour classer ces zoonoses alimentaires, Fosse réalise une hiérarchisation des risques (57). Sa méthode repose sur l'attribution d'une note de risque aux dangers, qui prend en considération des indicateurs quantitatifs de gravité des maladies alimentaires et l'évaluation de l'incidence des cas cliniques humains spécifiquement attribuables à la consommation d'un aliment donné.

Ainsi, pour la viande bovine, *Salmonella enterica* a la note de risque la plus élevée, devant les VTEC. Pour les viandes porcines, *Yersinia enterocolitica* apparaît comme le danger dont la note de risque est la plus élevée, devant *Salmonella enterica*. Pour les deux viandes, les *Campylobacter* spp. thermotolérants occupent le troisième rang (58).

Le réservoir naturel de ces bactéries *Salmonella*, *Campylobacter*, *E.coli* vérotoxino-gène, et *Yersinia*, est le tube digestif des mammifères ou des oiseaux. *Listeria monocytogenes* a aussi un réservoir digestif mais est plus ubiquiste : il existe notamment un réservoir tellurique. La voie d'entrée de ces bactéries chez l'Homme est digestive. Le mode de transmission de ces zoonoses est oral (mains sales) et surtout alimentaire. Les aliments incriminés dans la contamination humaine par ces agents zoonotiques sont essentiellement des Denrées d'Origine Animale et en particulier les viandes, puisque l'animal est réservoir.

### 1.1.2 Les aliments incriminés dans les zoonoses sont des viandes contaminées

Dans le domaine alimentaire, la contamination se définit comme le transfert direct ou indirect d'un contaminant provenant d'un réservoir vers un aliment (EUFIC, Conseil Européen de l'Information sur l'Alimentation). Ce contaminant peut être un agent physique, chimique ou biologique ajouté de façon non intentionnelle au produit (à la différence d'un résidu, par exemple un médicament vétérinaire) et pouvant compromettre la sécurité et/ou la salubrité du produit. Un contaminant est donc un danger au sens évoqué dans le règlement européen 178/2002, c'est-à-dire « un agent biologique, chimique ou physique présent dans les denrées alimentaires ou les aliments pour animaux, ou un état de ces denrées alimentaires ou aliments pour animaux, pouvant avoir un effet néfaste sur la santé ».

Les aliments contaminés mis en cause dans la plupart des cas déclarés de zoonoses alimentaires sont les produits d'origine animale et plus précisément les produits carnés. En effet, selon le rapport de l'EFSA de 2009, pour les quatre premières zoonoses en Europe (hors listériose attribuée à la consommation de lait cru), les fréquences les plus élevées de détection des agents zoonotiques sur les denrées alimentaires concernent les viandes, et en particulier les viandes dites « fraîches » (Tableau 1). Nous entendons ici par viande la définition donnée par les arrêtés ministériels du 17 mars 1992 et du 8 juin 1996, c'est-à-dire « toutes parties comestibles des volailles ou animaux de boucherie » définis respectivement par « les oiseaux appartenant aux espèces poule, dinde, pintade, canard et oie » et « les mammifères appartenant aux espèces bovine, porcine, ovine et caprin, ainsi que celles provenant des solipèdes domestiques (chevaux) ». Les viandes dites « fraîches » n'ont subi « aucun traitement de conservation autre que la réfrigération, la congélation ou la surgélation » selon le règlement 853/2004. On y inclut « les viandes conditionnées sous vide ou sous atmosphère contrôlée ».

Tableau I : Denrées analysées pour la recherche des principaux agents de zoonoses alimentaires ayant le taux de positivité le plus élevé (d'après le rapport de l'EFSA, 2009)

Nature de l'échantillon ayant le % de positivité le plus élevé	Agent zoonotique détecté	% positivité des échantillons testés
Viande fraîche de poulet	<i>Campylobacter</i> spp thermotolérants	26 %
	<i>Salmonella</i> sp.	5,50 %
Viande fraîche de porc	<i>Yersinia</i> sp.	2,00 %
Viande bovine fraîche	VTEC	0,30 %

Notons que tous les aliments n'ont pas été analysés dans le cadre de cette enquête européenne (EFSA 2009), mais seulement les aliments qui ont été identifiés comme présentant un risque élevé. Or les denrées carnées sont des aliments à haut

risque, du fait de la possibilité d'un transfert entre le tube digestif des animaux abattus et la carcasse et ses abats.

## 1.2 *Campylobacter* thermotolérants : des bactéries d'origine digestive

### 1.2.1 Caractéristiques biologiques

*Campylobacter* est un bacille fin (de 0,2 à 0,5 microns de diamètre sur 8 microns de long), de coloration Gram négative, spiralé en S ou de forme hélicoïdale (Figure 2) et mobile grâce à un unique flagelle de 20 nm de diamètre (150). Il est asporulé, et parfois capsulé. Lors des phases tardives de la courbe de croissance, ces bactéries prennent une forme plus arrondie, dite « coccoïde ».

Il se caractérise une très grande mobilité (aspect caractéristique en « vol de moucheron » lors de l'observation à l'état frais). Celle-ci lui permet de se déplacer dans le mucus intestinal. Le pH optimal de croissance est de 6,5 à 7,5 mais il résiste aux sels biliaires. Toutes les espèces du genre sont mésophiles et peuvent se développer à 37°C, mais on distingue les campylobacters dits thermotolérants des campylobacters non thermotolérants. Les campylobacters d'intérêt en santé publique sont les thermotolérants : leur température optimale de croissance est de 42 °C. Ils sont microaérophiles : ils nécessitent une faible teneur (3 à 15%) en O<sub>2</sub> pour leur croissance. Remarquons que *C. fetus*, non thermotolérant, est aussi pathogène pour l'homme mais son tropisme n'est pas digestif. Les campylobacters sont peu pathogènes pour l'animal excepté *C. fetus* dont la pathogénécité s'exprime surtout par des avortements chez les bovins et ovins. Les performances des animaux porteurs ne sont pas modifiées (148). L'historique de sa découverte et ses caractéristiques biochimiques et culturales sont détaillées en annexe 1.

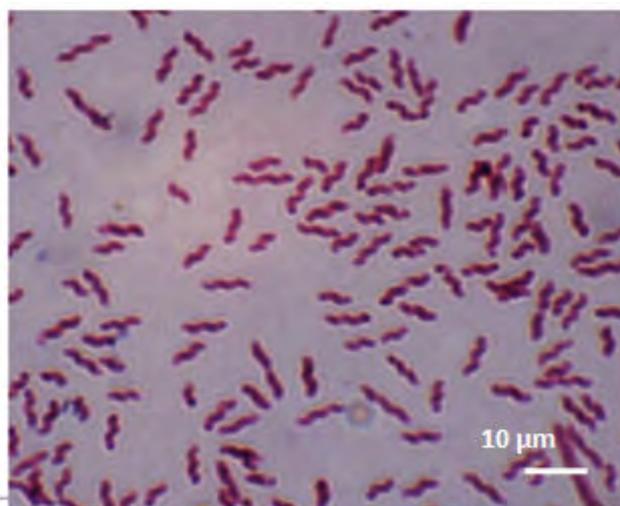


Figure 2 : *Campylobacter* spp. en microscopie optique (SECALIM)

Parmi les nombreuses espèces de *Campylobacter* thermotolérants (Annexe C), quatre sont incriminées le plus fréquemment dans les campylobactérioses humaines : *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* et *C. upsaliensis* (75). Elles appartiennent toutes aux campylobacters dits thermotolérants. D'après les isollements réalisés à partir des cas de campylobacterioses rapportés dans l'UE en 2007, *C. jejuni* représente 44,3% des isolats, *C. coli* représente 2,7% des isolats. D'autres espèces, comme *C. lari* (0,3 %) et *C. upsaliensis*, représentent au total 6,9% des isolats. 46% des isolats ne sont pas typés ou sont non typables. (43). En France, en 2007, sur les prélèvements réalisés sur des cas humains, *Campylobacter jejuni* (78,1% des souches caractérisables) est la souche la plus fréquente, suivie par *C. coli* (16,6%) et *Campylobacter fetus* (4,0 %). La proportion de *C. coli* isolés en France est plus élevée que dans d'autres pays européens (3% des

espèces déclarées au système européen de surveillance pour les gastroentérites). Une recrudescence des cas est remarquable en période estivale et est surtout marquée pour *C. jejuni*. (InVS, 2007).

### 1.2.2 Epidémiologie et symptômes chez l'Homme

Chez l'homme, la période d'incubation de la campylobactériose varie de un à trois jours. Des douleurs abdominales surviennent dans un contexte fébrile, suivies de diarrhée avec parfois du sang dans les selles et des vomissements. Le plus souvent, tout rentre dans l'ordre après quelques jours sans traitement si ce n'est une réhydratation chez les nourrissons. La symptomatologie est moins marquée que pour les infections à *Salmonella* et à *Shigella* (hyperthermie moins élevée) (110). Cette entérite peut se compliquer de bactériémie et de localisations secondaires (arthrites, pancréatites...), ainsi que d'un syndrome post-infectieux, tel que le syndrome de Guillain-Barré. Ce syndrome appelé aussi polyradiculonévrite aiguë correspond à une atteinte des nerfs périphériques (démýélinisation) de nature inflammatoire et probablement d'origine auto-immune, qui conduit à une paralysie progressive plus ou moins réversible.

L'infection chez l'Homme est souvent de forme sporadique mais *Campylobacter* peut aussi être à l'origine de TIAC (Toxi-Infection Alimentaire Collective) (125, 133). L'infection de l'homme se réalise souvent par contamination croisée lors de la préparation de viande mises en contact avec d'autres aliments qui ne nécessitent pas ou peu de cuisson (2, 109). Le lait, l'eau de rivière ou les eaux municipales traitées de façon inadéquate peuvent aussi provoquer des infections humaines (31). L'étude sur les facteurs de risque de survenue des infections à campylobacters en France a mis en évidence une association avec la consommation de bœuf peu cuit, une hygiène insuffisante des mains lors de la préparation en cuisine et un voyage à l'étranger (*Campylobacter* est en effet rapporté comme une cause de la diarrhée des voyageurs (47)).

En France, l'InVS (Institut de Veille Sanitaire) rapportait au total pour l'année 2007, 3058 cas confirmés de campylobactériose digestive (soit 4,8 cas confirmés pour 100 000 habitants) contre 2675 en 2006 (soit 4,3 cas confirmés pour 100 000 habitants) (48, 88).

Notons qu'il s'agit du nombre de cas rapportés, et non du nombre de cas réels. Le nombre de cas rapportés est une sous-estimation du nombre de cas réels puisque les symptômes chez l'homme sont souvent ceux d'une gastroentérite banale, et que la recherche coprologique n'est pas systématiquement réalisée. En effet, elle reste à l'initiative du microbiologiste sauf si elle est spécifiquement prescrite par le médecin contrairement aux Salmonelles et aux Shigelles recherchées systématiquement dans les coprocultures. La recherche de *Campylobacter* est plus lourde et plus coûteuse sans qu'il y ait une majoration forfaitaire de la coproculture (61).

## 1.3 La contamination des viandes lors des différentes étapes de la chaîne alimentaire : modalités du transfert et devenir des bactéries, notamment *Campylobacter*

### 1.3.1 Propositions de définitions

Dans le domaine de la sécurité et qualité des aliments, dans l'usage courant le mot « contamination » peut avoir deux sens. Il peut être employé pour décrire i) l'état de la denrée du fait de la présence d'un danger ou d'une flore d'altération, ou ii) l'introduction du danger au sein de la denrée.

Nous proposons de décrire la « contamination » au sens d'un transfert d'un danger à l'aliment (denrée) en tant que contamination primaire ou contamination secondaire.

- La contamination primaire peut être considérée comme le transfert du danger depuis son réservoir vers la denrée. C'est le cas par exemple, lorsqu'une partie du contenu digestif (réservoir) éclabousse la carcasse lors d'une mauvaise maîtrise de l'éviscération. On peut alors décrire la contamination primaire par la nature du réservoir, par exemple : la contamination primaire d'origine digestive quand le réservoir est le tube digestif.
- La(les) contamination(s) secondaire(s) peut être considérée comme le transfert du danger depuis une « source » secondaire vers la denrée. Par exemple, le matériel comme la planche à découper, le couteau, peut agir comme « source » intermédiaire ou secondaire. D'une manière générale, le matériel n'est pas au sens strict un réservoir du danger mais il s'agit plutôt d'un milieu de « dépôt » par lequel transite l'agent contaminant.

Nous retiendrons pour décrire la « contamination » dans son sens de l'état de la denrée du fait de la présence du danger, les deux éléments du statut de contamination (56) c'est à dire la fréquence (prévalence) de détection du danger dans la denrée, et le niveau de contamination c'est à dire la quantité de bactéries présentes (si techniquement possible).

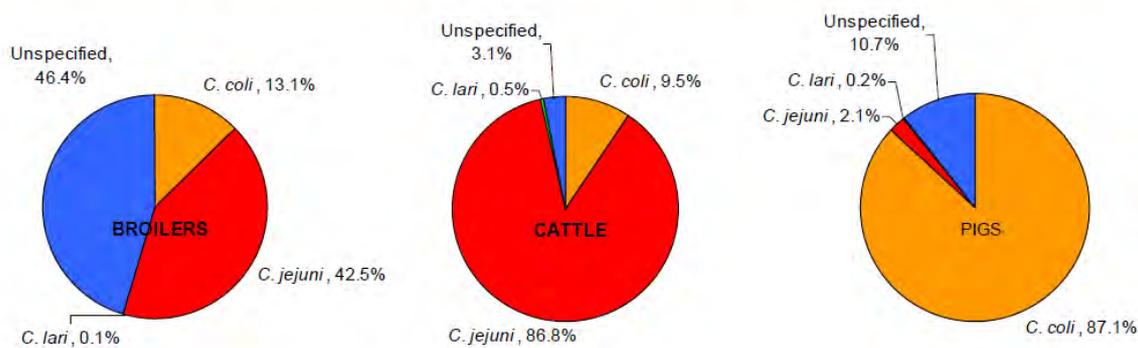
Les réservoirs majeurs des dangers bactériens les plus fréquents en Europe correspondent, chez l'animal, au contenu du tube digestif et à la peau (22, 137). La présence de ces dangers qu'elle soit cutanée ou digestive est la plupart du temps asymptomatique. Remarquons que la peau peut aussi constituer un réservoir secondaire si elle est souillée par des fèces (28, 82). D'autres réservoirs moins fréquents ou avec un niveau de présence du danger plus faible peuvent être le contenu d'abcès, ou le contenu de la mamelle. L'homme peut constituer un réservoir de certains dangers bactériens alimentaires, par les agents commensaux qu'il héberge, notamment *Staphylococcus aureus* sur la peau et dans l'oropharynx.

Le réservoir de *Campylobacter* est le contenu digestif des animaux homéothermes. Pour cette bactérie, il n'existe pas de réservoir hydro-tellurique connu et aucun portage asymptomatique chez l'Homme n'a été identifié. Chez l'animal, le portage de *Campylobacter* est asymptomatique (sauf pour *Campylobacter fetus* à l'origine d'avortements). Chez le porc, en 2004, lors d'une campagne de prélèvements de contenus rectaux de 250 porcs à l'abattoir menée en France, 100% des échantillons se sont révélés positifs pour *C. coli* (100). Le portage atteignait pour cette étude en moyenne 4,6 log (UFC/g) de fèces (entre 1,3 et 6,3 log (UFC/g)). Aux Etats-Unis, une étude réalisée sur les contenus rectaux de truies, de porcelets et de cochettes met en évidence un portage respectivement égal à 100%, 80% et 76% (168). En 2007, en France, lors d'une étude sur les facteurs de risques pour *Campylobacter* en élevage de poulets de chair, sur 73 élevages, 71,2% des bandes se sont révélées positives pour *Campylobacter* (77). Une étude américaine réalisée sur des contenus caecaux de poulets montre une prévalence de 63% avec un portage moyen de 6,8 log (UFC/g) de matière fécale (119). Les études faites par Skirrow (1982) et Prescott et Munroe (1984) ont montré la présence de *Campylobacter jejuni* dans les caecal de 100% des 600 dindes examinées (132, 142). La bactérie *C. jejuni* a été isolée au Danemark dans 23% des fèces de vaches adultes (15 vaches testées dans 24 élevages différents) avec un portage moyen de 2,1 log (UFC/g) de matière fécale (122). Elle a également été isolée dans les fèces de nombreux mammifères et oiseaux sauvages (118). En conclusion, qu'il s'agisse de mammifères ou de volailles, le portage est très fréquent. Néanmoins, le portage est plus important, en quantité, chez le porc et la volaille.

Les contaminations primaires par *Campylobacter* sont très importantes en fréquence et en nombre, comme en témoigne la fréquence de détection sur carcasses de volailles (broilers), de bovins (cattle) et de porcs (pigs) (Figure 3). Parmi les quatre espèces de *Campylobacter* thermotolérants, les espèces les plus fréquemment isolées sur les viandes sont *C. coli* et *C. jejuni*. Pour les viandes de volailles, en France, les prévalences, sont de 86,5% sur les échantillons testés (EFSA, 2007). Cette

contamination élevée est le reflet d'une prévalence élevée chez l'animal vivant mais aussi de la technique d'abattage (cadences rapides, petites carcasses ...). La présence de peau sur de nombreux produits de volailles est aussi responsable de cette prévalence (29). Les contaminations au cours de l'éviscération sont en partie à l'origine de la souillure des carcasses de volailles commercialisées (EFSA, 2004). Le niveau de contamination des carcasses de volailles varie entre 3 et 5 log (UFC/cm<sup>2</sup>) (10, 12, 134, 146).

Notons que les contaminations croisées sont possibles qu'elles sont souvent incriminées dans les TIAC à *Campylobacter* (2, 73, 81, 109, 136). Par exemple, une contamination croisée peut se réaliser en cuisine par un transfert volailles/crudités.



Broilers: Source: Austria, the Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Italy, Latvia, Slovenia, Spain, Sweden, Norway, Switzerland (N=19,328)

Cattle: Source: Austria, Denmark, Germany, Hungary, Ireland, Italy, Luxembourg, the Netherlands, Poland, Slovakia, Spain, Norway (N=12,669)

Pigs: Source: Denmark, France, Germany, Italy, Slovakia, Spain (N=1,102)

Figure 3 : Distribution par espèces des isolats de *Campylobacter* positifs issus de viandes de porcs, de bovins et de volailles (43)

Pour les viandes de porc, Fosse et ses collaborateurs montrent que sur 228 pools de carcasses de porcs, 34,6% d'entre eux présentent un prélèvement de gorge et/ou de bavette contaminé par *Campylobacter* (contre 100% de prévalence sur les contenus rectaux en élevage) (56). Le portage concerne majoritairement *C. coli*. La prévalence est donc élevée chez les porcs vivants mais la technique d'abattage chez les porcs permet une relative maîtrise du nombre de carcasses contaminées (127). Le niveau de contamination des carcasses varie entre -0,4 et 2,5 log UFC/cm<sup>2</sup> avec une moyenne de 0,5 log (UFC/g) (51, 100).

Les données disponibles sur les bovins font état d'une faible contamination des viandes (138). En effet, le taux de positivité des échantillons de viande en Europe varie entre 0,9 et 0,3% entre 2002 et 2006 (EFSA, 2007). Très peu de données sont en revanche disponibles quant au niveau de contamination de ces viandes. Une étude de l'USDA (United States Department of Agriculture) révèle une contamination des carcasses atteignant en moyenne 0,1 UFC/cm<sup>2</sup>.

### 1.3.1 Modalités de la contamination des carcasses

La contamination d'une viande peut avoir lieu aux différentes étapes de la chaîne alimentaire : dans l'élevage, lors de l'abattage, lors de la préparation des carcasses, ou bien dans nos cuisines. L'hygiène des viandes, c'est-à-dire « l'ensemble des mesures nécessaires pour assurer la sécurité et la salubrité des viandes à toutes les étapes de la chaîne alimentaire » (AFNOR NF V01-002), concerne donc l'ensemble de la filière, de l'éleveur au consommateur. En matière de sécurité alimentaire, le respect des bonnes pratiques d'hygiène dès la production primaire, se révèle essentiel du fait que les animaux peuvent être des porteurs sains de dangers (22, 137). Toutefois, c'est lors de l'abattage que la probabilité de contamination est la plus élevée (95). L'abattage est

l'étape de la chaîne de production des viandes et des produits carnés qui transforme un animal de production vivant déclaré manifestement propre à la consommation humaine en une carcasse (ou deux demi-carcasses chez les porcs et les bovins) et ses abats. Cette étape est extrêmement délicate. Il s'agit en effet de séparer la carcasse de deux éléments fortement contaminés que sont les phanères non comestibles d'une part (cuir chez les bovins, soies chez les porcs et plumes chez les volailles), et le tractus digestif de l'autre. Cela nécessite la manipulation de ces réservoirs de contamination. Ces opérations favorisent le dépôt plus ou moins direct de germes sur les masses musculaires nouvellement mises à nues (22).

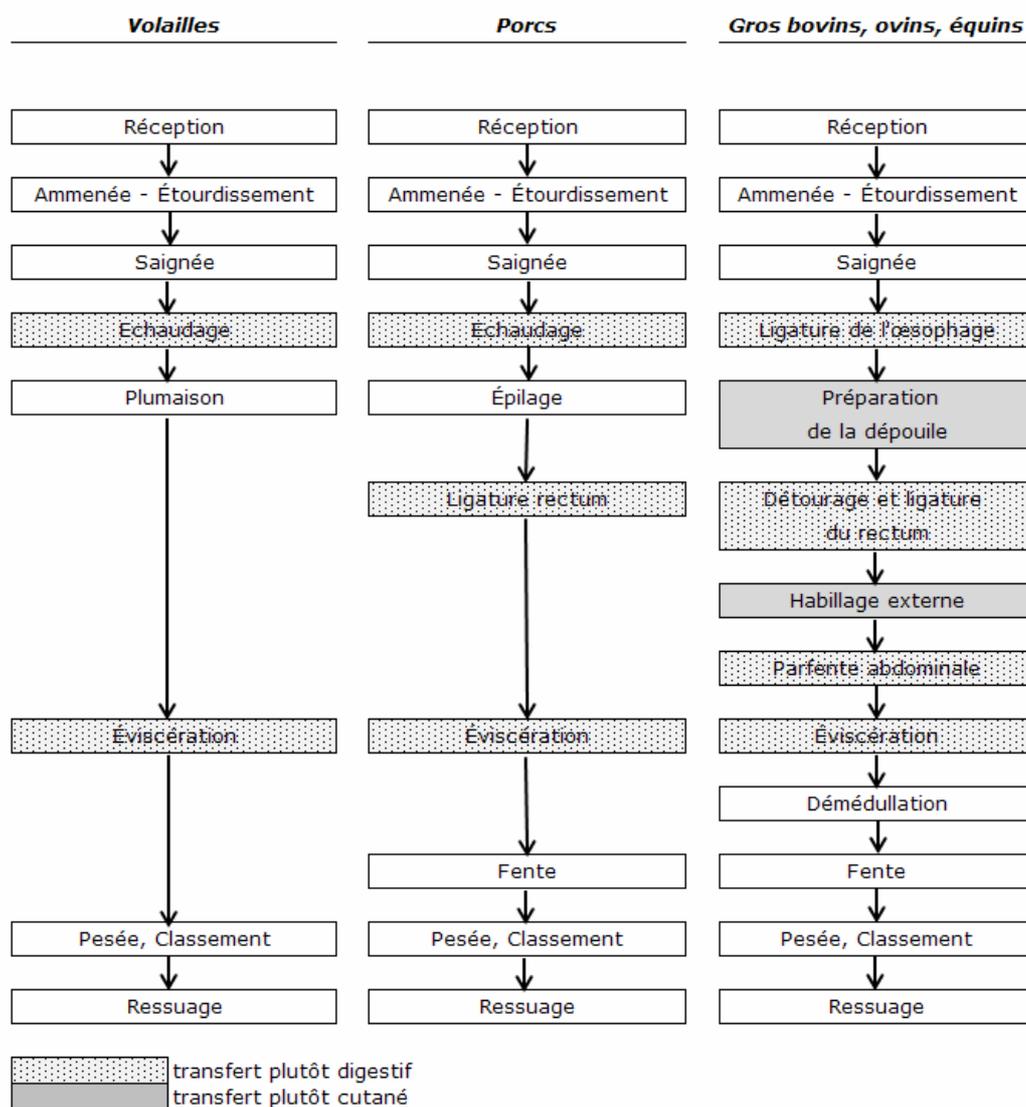


Figure 4 : Diagramme simplifié des opérations à risque élevé de contamination primaire pour l'abattage des porcs, des volailles et des gros bovins (hors opérations de contrôles : bien-être animal, traçabilité, inspection sanitaire).

Selon les espèces, le process présente des opérations unitaires différentes avec des risques de transfert plus ou moins élevé. Ainsi les principales étapes à risque vis-à-vis d'une contamination primaire sont (Figure 4) (82) :

- Chez les bovins : la découpe de la mamelle, la ligature de l'œsophage, la dépouille, le détourage et l'ensachage du rectum, l'habillage, l'émoussage, et l'éviscération
- Chez les porcins : l'échaudage, l'épilage, et l'éviscération
- Chez les volailles : l'échaudage, la plumaison, et l'éviscération.

Des contaminations secondaires peuvent aussi se réaliser via le matériel, le personnel, l'eau, l'air, les nuisibles. Nous retrouvons ici les « règles des 5 M »: Main-d'œuvre, Matériel, Méthode, Milieu, Matière, devant être contrôlées.

Ainsi par exemple, si une erreur d'éviscération est réalisée et contamine la face externe d'une carcasse, celle-ci peut à son tour contaminer une autre carcasse avec qui elle serait en contact lors de la phase d'attente pour la fente.

Le risque de contamination à l'abattoir est connu de longue date et c'est pour maîtriser ce risque qu'ont été instaurées les Bonnes Pratiques d'Hygiène (28, 82, 137). Néanmoins, ce risque a été peu quantifié. Les travaux de Fosse et ses collaborateurs apportent dans ce domaine et pour la filière porcine, grâce au portage très élevé de *Campylobacter* dans le tube digestif des porcs destinés à être abattus (100% des 130 pools de 5 contenus digestifs de porcs obtenus sur les 36 lots suivis), une quantification du taux global (primaire et secondaire) de transfert des dangers à réservoir digestif lors des opérations d'abattage de porcs charcutiers (3 abattoirs testés) (51). Ce taux de transfert calculé est de 89% pour *Campylobacter* (sur les 36 lots déclarés positifs sur fèces à l'entrée en abattoir, 32 sont retrouvés positifs sur carcasses). Leurs résultats montrent également des différences entre les abattoirs attribuables à des niveaux de maîtrise de l'hygiène différents mais aussi la possibilité d'une maîtrise de ce transfert puisque quatre lots, positifs à l'entrée en abattoir, sont négatifs sur carcasses. Pour les autres dangers spécifiques de l'espèce porcine, les taux de transfert calculés sont inférieurs à celui de *Campylobacter* (64% pour *Clostridium* et 45% pour *Salmonella enterica*).

Ces résultats confirment donc la probabilité élevée de contaminer les carcasses lorsqu'un lot d'animaux porteurs de dangers bactériens est abattu, plus particulièrement pour des dangers à réservoir digestif. Nous devons maintenant nous demander quel est le devenir de ces bactéries présentes en surface de la viande ?

## 2 Devenir des bactéries en surface des carcasses

Le devenir des bactéries en surface des viandes peut être étudié du point de vue de l'état de la bactérie : mort, survie, développement et multiplication, mais aussi du point de vue de l'ampleur de la contamination de la denrée : adhésion, pénétration, ou dispersion des bactéries sur la matrice carnée. Ces notions sont essentielles dans la mesure où elles conditionnent le statut de dangerosité de la denrée. Alors que beaucoup d'essais s'intéressent à la survie de ces bactéries en surface, seules quelques études concernent l'évolution de la denrée en rapport avec le comportement microscopique des bactéries.

### 2.1 Comportement des bactéries sur matrices carnées et conséquences sur l'état de contamination de la denrée

Dans les conditions normales, les muscles des animaux ne contiennent pas de microorganismes (64, 135). C'est seulement dans le cas de maladies infectieuses avec septicémie, qu'ils peuvent en héberger (salmonelloses aiguës) (26 cité par , 137). La viande est malgré tout une denrée particulièrement sensible au niveau microbiologique, car, quelle que soit l'espèce animale considérée, elle constitue un milieu favorable à la multiplication et à la survie des micro-organismes.

Les modalités de la croissance et de la survie sur viande sont vraisemblablement différentes de celles recensées sur milieu nutritif dans la base de données utilisée par le Pathogen Modelling Program, un logiciel de microbiologie prévisionnelle utilisé en industrie alimentaire pour estimer le comportement de certaines bactéries en fonction de la variation de facteurs intrinsèques et extrinsèques (17, 151). D'autres facteurs de variations rentrent en effet en jeu sur ces matrices complexes et les caractéristiques de développement des bactéries y sont spécifiques. Il n'y a par exemple pas nécessairement

de phase de latence sur matrice viande (151). Par ailleurs, les études sur matrices carnées, sont délicates en raison de la dénaturation rapide de ces produits à température ambiante. Celles dont nous disposons caractérisent la croissance sur matrice carnée de façon partielle, et dans la plupart des cas, il s'agit d'études de survie à basse température.

*E.coli*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica* et *Campylobacter* sont mis en évidence non seulement à l'abattoir mais aussi dans des étapes ultérieures de la chaîne de transformation voir dans les produits finaux, ce qui souligne la capacité de ces bactéries à survivre sur les matrices carnées. Des études *in vitro* montrent que les dangers *E.coli* vérotoxino-gène, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* et *Listeria monocytogenes* lorsqu'ils contaminent la viande, peuvent survivre et se multiplier en surface, et ce, parfois même, à basse température (72, 99, 123, 151, 165). Une étude montre par exemple que *E coli* vérotoxino-gène (O157 : H7) survit à 5 °C sur viande de bœuf et s'y multiplie entre 6 et 45°C (151). Contrairement à ces quatre bactéries, *Campylobacter* survit sur la viande de -20 °C à 42 °C mais ne s'y multiplie pas en présence d'air ambiant (69, 85, 116, 145, 167). La capacité de ces bactéries à se multiplier sur la viande qui conditionne la population bactérienne présente *in fine* dans la denrée carnée, doit être mise en relation avec leur dose infectante : elle est faible pour *E. coli* vérotoxino-gène (inférieure à 100 bactéries), un peu plus élevée pour *Campylobacter* (quelques centaines) et encore plus élevée pour *Salmonella* ( $10^5$  à  $10^8$ ) (21).

La croissance et la survie de ces bactéries sur viande peuvent être influencées par de nombreux paramètres. Certains sont classiquement étudiés sur milieu nutritif tels que la température, la nature de l'atmosphère, la disponibilité en eau, le pH du milieu. D'autres sont spécifiques de la matrice viande utilisée, comme la composition biochimique (teneur en matière grasse par exemple) qui varie selon l'animal et le muscle, la découpe/le hachage de la viande, la nature de la surface de contact, le niveau de contamination par la flore mésophile totale (13, 102). Le hachage peut favoriser par exemple la croissance des bactéries, par la libération des nutriments et de l'eau suite à la rupture des membranes cellulaires qu'il entraîne (13). Lorsque le niveau de contamination par la flore mésophile totale est élevé, la multiplication des bactéries inoculées sur viande peut être ralentie (126, 163).

Si ces bactéries d'origine digestive survivent en surface des carcasses, leur comportement microscopique comme la persistance, la mobilité, l'adhésion, la pénétration, influence le devenir de la denrée du point de vue de la contamination. Très peu de données sont disponibles quant aux facteurs de variations du comportement microscopique des bactéries en surface des carcasses. Quelques rares études concernent l'adhésion à la surface du muscle. Certaines études, utilisant des cultures cellulaires, évaluent les modalités d'adhésion aux entérocytes, qui font partie des cellules cibles (7, 63, 86). D'autres essais étudient l'adhésion de ces dangers à des surfaces inertes (biofilm dans le cas de *Listeria*), ce qui conditionne les contaminations secondaires (35, 112, 149). *Campylobacter* ( $10^5$  UFC/cm<sup>2</sup>) survit pendant 4 h dans des conditions d'humidité faible sur un plan de travail en inox, plusieurs semaines dans une éponge et le taux de transfert sur les denrées varie de 70 à 100% (94, 108).

En revanche, la pénétration des bactéries en profondeur du muscle a été plus étudiée. Malgré tout, ces études restent peu nombreuses, assez anciennes et parfois contradictoires. Si Elmoossalami et ses collaborateurs montrent que certaines bactéries mésophiles peuvent pénétrer au sein d'une viande (46), Thomas montre pour sa part qu'aucune bactérie mésophile ne peut être détectée sous une profondeur de 2 cm dans de la viande stockée à température ambiante pendant deux jours (152). Gill et Penney élaborent un modèle pour évaluer la pénétration des bactéries dans la viande (67). Ils montrent que des bactéries protéolytiques mobiles ou non mobiles pénètrent sur 2 cm d'épaisseur en moins de 36 h à 30°C. Par contre, les bactéries non protéolytiques ne semblent pas pénétrer après 7 jours à 30°C. Ils montrent aussi que la pénétration au sein du tissu musculaire résulte de la destruction ou de l'altération par protéolyse de la barrière conjonctive qui relie les fibres musculaires entre elles. Remarquons que

*Salmonella*, *E. coli*, *Campylobacter*, *Yersinia* et *Listeria* ne sont pas des bactéries protéolytiques (49).

La dispersion, autre phénomène qui peut intervenir après que des bactéries aient été déposées sur une surface, sera étudiée lorsque nous envisagerons les différentes méthodes de décontamination.

D'après des essais rapportés dans la littérature, nous avons retenu trois principaux paramètres qui conditionnent la survie, le développement et/ou la multiplication des bactéries d'origine digestive lorsqu'elles sont déposées sur la carcasse et qui seraient donc susceptibles d'influencer le comportement des bactéries sur la viande. Il s'agit de la nature de la surface de dépôt, de la température ambiante et de celle de la matrice, et du temps de contact.

Les facteurs de variations du devenir des bactéries sur matrice carnée sont très nombreux. Il sont constitués de facteurs de variation physiques classiquement étudiés sur milieu nutritif (pH, température, atmosphère) *in vitro* mais aussi de facteurs spécifiques liés à la complexité de la matrices carnée.

## 2.2 Quelques facteurs de variations du devenir des bactéries sur matrice carnée

### 2.2.1 La nature de la surface de contact

- Les structures histologiques

Lorsqu'elles sont déposées en surface de la carcasse, les bactéries d'origine digestive peuvent entrer en contact avec différentes structures histologiques selon l'endroit de la carcasse où le contenu digestif est projeté : du tissu musculaire squelettique, du tissu conjonctivo-adipeux, de la peau pour les carcasses en peau (porcs, volailles) ou du tissu conjonctif tel que les séreuses comme le péritoine, lorsque la contamination s'effectue en face interne de la carcasse. Selon la nature de la surface de contact, le comportement des bactéries peut être différent.

#### Le muscle

Le muscle (viande) est constitué de différents éléments : des fibres musculaires, du tissu conjonctif, des vaisseaux sanguins.

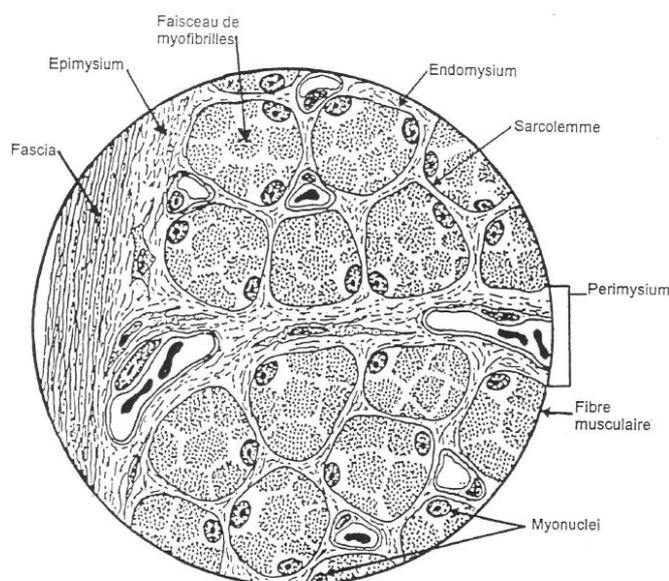


Figure 5 : Schéma histologique d'une coupe transversale d'un muscle strié squelettique, d'après(153).

La cellule musculaire ou myocyte en est l'unité de base. Elle est entourée d'un tissu conjonctif lâche endomysium, dans lequel circulent les ramifications nerveuses capillaires et lymphatiques. Ces cellules sont regroupées en faisceaux, eux mêmes entourés par un autre conjonctif lâche, le périnysium. Plusieurs faisceaux sont regroupés dans une dernière gaine de tissu conjonctif, l'épimysium. L'épimysium est lié au fascia, tissu conjonctif dense entourant tout le muscle (Figure 5). Par conséquent, les bactéries qui se trouveront en contact avec le muscle, seront potentiellement sur des surfaces histologiques différentes.

#### Le péritoine : un tissu conjonctif

Le péritoine est constitué d'une seule rangée de cellules mésothéliales aplaties, pourvues de microvillosités et de vésicules de pinocytose. Ces cellules sont disposées sur un socle de tissu conjonctivo-élastique et cellulo-grasieux (Figure 6). Le tissu sous-séreux est riche en vaisseaux sanguins et en terminaisons nerveuses surtout dans le feuillet pariétal. Les vaisseaux sanguins sont assez profonds et clairsemés, les vaisseaux lymphatiques sont nombreux et de grande taille.



Figure 6 : Schéma histologique en coupe du péritoine d'un mammifère, d'après (30).

## La peau

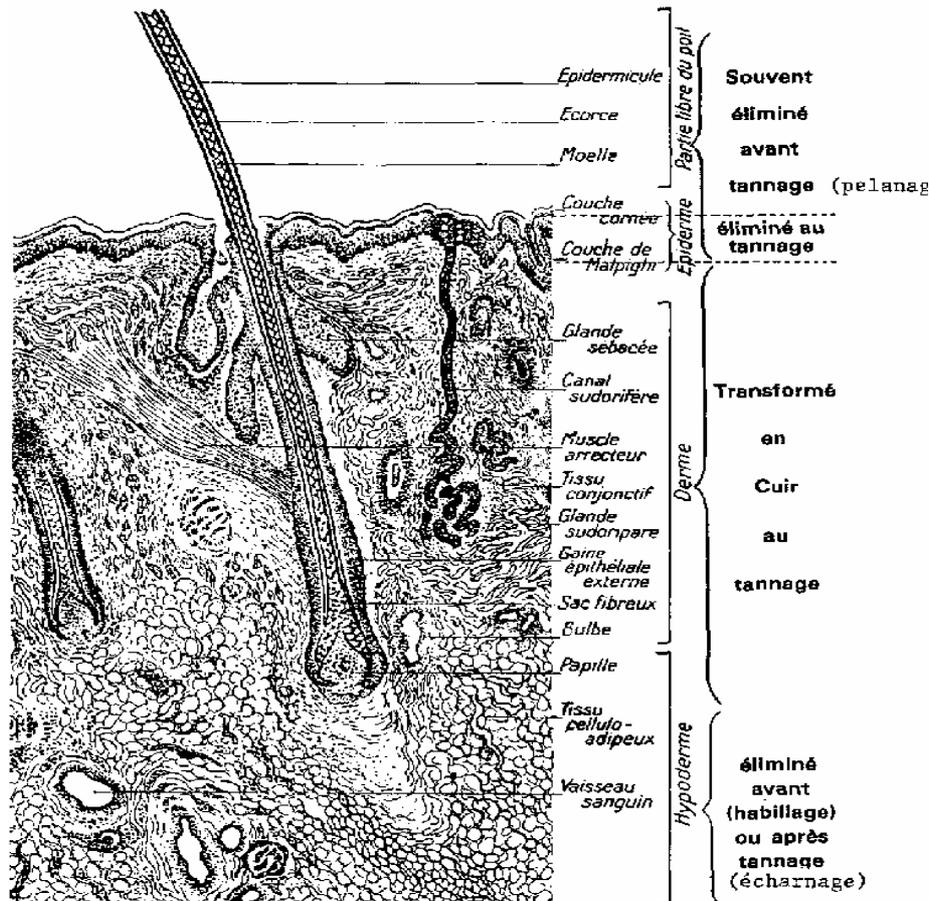


Figure 7 : Schéma histologique de la peau d'un mammifère, d'après (40).

La peau est un organe composé de trois tissus (Figure 7) : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'épiderme est un épithélium pavimenteux, stratifié, kératinisé composé de kératinocytes dérivés d'une couche basale unique. Le derme est un tissu conjonctif lâche contenant des vaisseaux sanguins, lymphatiques, des nerfs et des formations épidermiques : les follicules pileux, les glandes sébacées et sudoripares chez les Mammifères et les follicules plumeux chez les Oiseaux. L'hypoderme est un tissu conjonctif lâche contenant des adipocytes (pannicule adipeux chez les animaux à forte masse grasseuse).

Notons que *Campylobacter* a une capacité de survie particulière sur la peau de poulet : il s'accumule dans les follicules plumeux qui constituent un environnement favorable par sa disponibilité en eau et sa faible teneur en  $O_2$  (29).

- La composition biochimique du muscle

La composition varie bien sûr suivant les animaux et, chez un même animal, d'un muscle à l'autre. Il est toutefois possible de retenir un ordre de grandeur pour les proportions des différents constituants (42) :

- Eau 75-80%
- Protéines 15-20%
- Substances azotées non protéiques 1%
- Lipides 3%
- Glycogène 1%
- Sels minéraux 1%.

Selon le métabolisme des bactéries, ce milieu sera plus ou moins favorable à leur croissance.

## 2.2.2 La température

Les données concernant l'influence de la température sur le comportement des bactéries sur matrice carnée, évaluent surtout la survie et/ou la multiplication à basse température en raison des applications pratiques au niveau de la chaîne du froid. *Campylobacter* ne se multiplie pas mais survit très bien à 4°C, ainsi qu'à -3°C, et même à -20°C sur peau et muscle de poulet (14, 36). La population de *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 est réduite au dixième en 11,5 jours à 4°C sur viande de porc et en 5,4 jour à 4°C sur couenne à l'air ambiant (84). *C. jejuni* peut survivre pendant plusieurs semaines à 4°C sur peaux et viandes de poulets (14) ou dans les réserves naturelles d'eau (34). A l'inverse, la cuisson (60°C à cœur) les inactive (147). La particularité de cette bactérie est donc sa capacité de survie dans le milieu extérieur, en dépit de ses exigences de croissance.

Peu d'études concernent la multiplication sur matrice carnée pour des températures plus élevées en raison de l'altération rapide des produits dans ces conditions (72). Contrairement à *Campylobacter*, *E. coli* ou *Salmonella* peuvent se multiplier à 25°C. Les températures optimales pour la croissance des bactéries sont principalement étudiées sur milieu nutritif (Tableau 2) et donc, en théorie, non transposables sur viande. Ils indiquent cependant un intervalle de température approximatif pour lequel la bactérie peut se multiplier et, nous devons donc en tenir compte.

Tableau II : Température optimale de croissance et gamme de croissance (17, 18)

Température en °C	Minimum	Optimum	Maximum
<i>Escherichia coli</i>	7-8	35-40	44-46
<i>Campylobacter jejuni</i>	32	42-43	45
<i>Salmonella ssp</i>	5	35-43	46
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-1,3	25-37	42
<i>Listeria monocytogenes</i>	-0,4	37	45

A l'abattoir, toutes les bactéries citées se multiplient bien à température ambiante (entre 10 et 25°C) à l'exception de *Campylobacter*. *Campylobacter* survit mais ne se multiplie pas pour des températures inférieures à 25°C.

## 2.2.3 Le temps de contact

Le délai de transit (entre amenée et ressuage) de la carcasse sur la chaîne d'abattage est inférieur à deux heures, durée très compatible avec la survie (96). Les *Campylobacter* survivent sur les carcasses le long de la chaîne d'abattage.

Le devenir des bactéries pathogènes provenant d'une contamination digestive en surface d'une carcasse conditionne la dangerosité de la denrée. Ce devenir est influencé par des facteurs extrinsèques et intrinsèques à la denrée. La maîtrise des facteurs extrinsèques, tels que le taux d'humidité, la température ambiante... ne permet pas de garantir un niveau élevé de sécurité du consommateur, étant donné la capacité particulière de survie de ces bactéries sur les matrices carnées. Pour diminuer le risque, mais aussi pour répondre à la réglementation, tous les professionnels de la filière doivent mettre en place des outils permettant la maîtrise, le contrôle et l'amélioration de la qualité microbiologique de leurs produits.

### 3. Maîtrise de la contamination d'origine digestive des carcasses à l'abattoir

#### 3.1 Prévention et/ou décontamination : un débat socio-économique actuel

Le cadre législatif concernant l'hygiène des aliments a évolué ces dernières années en Europe et en France. Il est composé de textes qui réglementent, de façon générale, les différents process de l'industrie alimentaire afin de garantir la sécurité des denrées. Certains concernent spécifiquement l'hygiène de l'abattage des animaux de production. Ces règles précisent notamment la conduite à tenir en cas de contamination sur la chaîne, et les exigences en matière de « décontamination ». Si les moyens de maîtrise de la contamination préconisés en Europe sont principalement préventifs, des mesures correctives de « décontamination » se sont développées outre-Atlantique.

Ces mesures correctives s'organisent autour d'un principe dit de « décontamination » des denrées par différents traitements visant à limiter, inactiver, détruire les bactéries présentes ou empêcher leur multiplication. Ces pratiques de décontamination, non encore mises en œuvre sur les viandes fraîches en Europe, mais utilisées couramment en Amérique du Nord, alimentent un intense débat entre les consommateurs, les experts scientifiques et les politiques. En effet, ces méthodes sont présentées comme garantes d'une sécurité microbiologique accrue du consommateur, et sont donc, à ce titre très séduisantes. Mais leur utilisation rompt d'une part avec la politique française et européenne de prévention « de la ferme à la fourchette » et soulève des interrogations quant aux risques chimiques de ces procédés (résidus, acquisition de résistances chez les bactéries).

Lorsqu'en 2006, la Commission Européenne présente un projet de Règlement autorisant l'utilisation des substances antimicrobiennes pour la décontamination des carcasses de volailles, le débat s'intensifie (ce projet s'appuie sur le règlement 853/2004 donnant la possibilité de recourir à d'autres substances que l'eau potable pour éliminer la contamination de surface des aliments). C'est dans ce contexte que parurent deux avis de l'Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments (avis du 20 mars 2007 concernant le projet de Règlement européen de 2006 relatif à la décontamination des carcasses de volailles par utilisation de quatre substances chimiques et l'avis du 19 juin 2007 sur les méthodes alternatives à la décontamination chimique des carcasses) soulignant les avantages économiques et les effets microbiologiques de tels procédés mais mettant en garde sur la diminution de la vigilance en amont qui serait la conséquence possible de leur généralisation (1). L'efficacité microbiologique est réelle quand le travail en amont est réalisé soigneusement mais la durabilité économique de tels procédés est discutable : même si leur utilisation permet de diminuer les saisies, leur mise en place et leur utilisation a un coût certain (temps passé, maintenance, produits coûteux).

L'AFSSA a par ailleurs soulevé certaines questions quant à la possibilité d'induction de mécanismes d'adaptation permettant aux pathogènes de résister à ces stress chimiques (1). Même si pour les substances concernées, les mécanismes d'adaptation semblent peu spécifiques, il a été démontré que l'utilisation de désinfectants peut permettre une survie plus importante de bactéries naturellement résistantes. Par conséquent, devant le manque de données, des précautions doivent être prises.

Par ailleurs, ces mesures correctives de « décontamination » des viandes restent particulièrement mal perçues par le consommateur et les politiques comme en témoigne « l'affaire des volailles chlorées » (59). Ainsi en mai 2008, la Commission européenne a proposé la levée de l'interdiction (datant de 1997) de l'importation des volailles américaines traitées au chlore, et d'autoriser parallèlement l'utilisation de tels traitements en Europe (59). L'AESA (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments) a en

effet rendu, en décembre 2005, un avis concluant à l'absence de risque toxicologique lié à l'utilisation de ces produits chimiques (dioxyde de chlore, chlorure de sodium acidifié, phosphate trisodique ou encore acides peroxydés) (44, 45). Mais les experts vétérinaires de 26 Etats membres sur 27 ainsi que les eurodéputés ont exprimé fermement leur refus de lever cette interdiction au vu de l'impact sur la confiance des consommateurs dans les filières viandes, déjà fragile et au vu des risques professionnels (115).

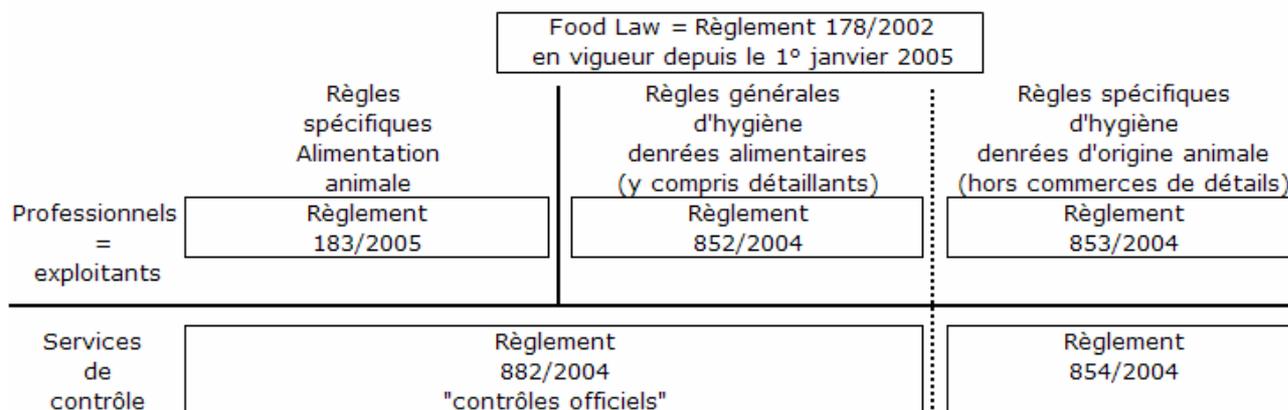
Ces faits d'actualité montrent à quel point la contamination bactérienne d'origine digestive des viandes et les techniques de décontamination constituent une problématique en Europe. L'hostilité de l'opinion publique vis-à-vis de l'utilisation de ces traitements décontaminants s'explique en partie par la politique préventive menée jusqu'alors par l'Europe en matière de sécurité alimentaire. Depuis une vingtaine d'années, la Commission Européenne, a en effet travaillé à la mise en place d'un cadre réglementaire préventif commun aux Etats membres afin de garantir la sécurité des denrées à tous les niveaux de la chaîne de production, forgeant ainsi une certaine idée de la sécurité alimentaire en Europe.

### 3.2 Bases du contexte réglementaire français et européen régissant l'hygiène des viandes et leur contamination à l'abattoir

En France, les grandes orientations réglementaires sur l'hygiène des viandes ont été fixées dans le Code Rural et le Code de la Consommation. Avec le développement communautaire des échanges et du commerce dans les années 1990, naissent des exigences en matière d'hygiène des denrées échangées. De nombreuses lois et normes viennent alors préciser les dispositions auxquelles doivent satisfaire les viandes fraîches mises sur le marché. C'est l'arrêté ministériel du 17 mars 1992, relatif aux conditions que doivent remplir les abattoirs d'animaux de boucherie pour la production et la mise sur le marché de viandes fraîches, qui précise des mesures générales d'hygiène à respecter en abattoir. Cet arrêté a été modifié à plusieurs reprises dans un souci d'adaptabilité à la législation européenne. Ce sont les exigences communautaires qui ont entraîné la création ou la modification en droit français de textes relatifs à l'hygiène des denrées.

Le règlement 178/2002 du 28 janvier 2002 ou « Food Law » établit en effet les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire applicables en l'état par les Etats membres. Il institue l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (AESAs) et fixe les procédures relatives à la sécurité alimentaire, notamment l'analyse, l'évaluation et la gestion du risque, la communication sur les risques ainsi que le principe de précaution. Ce texte fondateur est à la base d'une refonte en profondeur des exigences réglementaires en matière d'hygiène des denrées alimentaires et des aliments pour animaux et met en avant une politique de prévention. Il est complété de sept autres textes qui constituent ce que l'on appelle communément le Paquet Hygiène (règlements 183/2005, 852/2004, 853/2004, 854/2004, 855/2004 et directives 2002/99 et 2004/41) (Figure 8).

## Architecture du Paquet Hygiène



Le paquet hygiène comprend également deux directives : directive 2002/99 : police sanitaire  
directive 2004/41 : directive d'abrogation

Paquet hygiène *sensu stricto*

Figure 8 : Architecture réglementaire du Paquet Hygiène.

La création du paquet hygiène a plusieurs objectifs :

- fusionner, harmoniser et simplifier la législation communautaire sur la sécurité des aliments et fixer les objectifs à atteindre en la matière
- mettre en place une politique unique claire et transparente pour l'ensemble des opérateurs du secteur alimentaire depuis la production primaire jusqu'à la distribution des produits au consommateur final
- responsabiliser l'ensemble des maillons de la chaîne alimentaire en matière d'hygiène afin d'améliorer les systèmes de sécurité des aliments actuellement en vigueur.

Trois règlements rassemblent les préconisations et exigences réglementaires. Il s'agit :

- du règlement 852/2004 qui établit les règles d'hygiène générales applicables à toutes les denrées alimentaires pour l'ensemble des exploitants du secteur alimentaire : contrôle des températures, respect de la chaîne du froid, prélèvements d'échantillons, analyse des dangers et maîtrise des points critiques (Hazard Analysis Critical Control Point ou HACCP), Guide des Bonnes Pratiques d'Hygiène (GBPH), enregistrement des établissements et conditions à l'importation et à l'exportation.
- du règlement 853/2004 qui fixe les règles d'hygiène pour les denrées d'origine animale. Les activités d'abattage doivent faire l'objet d'une agrémentation et d'un enregistrement. Les carcasses doivent présenter un marquage de salubrité et une identification liée aux documents accompagnant l'animal (traçabilité, responsabilité et hygiène). Enfin, il précise l'obligation pour les abattoirs de prendre des dispositions spécifiques d'hygiène par la mise en place de l'HACCP.
- du règlement 854/2004 qui décrit les règles de contrôle par les services officiels des établissements d'abattage et des denrées produites.

Nous allons insister sur les deux derniers puisqu'ils concernent plus précisément le domaine qui nous intéresse ici : la contamination des viandes à l'abattoir et sa maîtrise.

Le règlement 853/2004 met en place un cadre préventif, définit les exigences en matière d'hygiène des viandes, et précise les mesures générales qui doivent être obligatoirement mises en œuvre pour diminuer le risque de contamination. Le règlement 854/2004 définit comme impropre à la consommation, « toute viande présentant une contamination fécale, par souillure ou autre. ». Ce qui implique, du fait du règlement 178/2002 (chapitre 2, section 4, article 14, alinéa 1: « Aucune denrée alimentaire n'est mise sur le marché si elle est dangereuse », c'est-à-dire si « elle est préjudiciable à la

santé ou impropre à la consommation humaine »), que toute carcasse contaminée doit faire l'objet d'un retrait partiel ou total. Cependant, le règlement 853/2004 (annexe III, chapitre 4, alinéa 10) reconnaît la possibilité d'actions correctives de la contamination : « les carcasses doivent être exemptes de toute contamination fécale visible. Toute contamination visible doit être éliminée sans tarder par le parage ou tout autre procédé ayant un effet équivalent. ». Ce règlement laisse donc une certaine liberté quant au moyen utilisé, mais met néanmoins en avant une correction de la contamination par le parage, c'est-à-dire par découpe et élimination d'une partie de la carcasse. Néanmoins, il ne précise pas les opérations ayant un effet équivalent au parage. Pourtant, il apparaît, selon le règlement 854/2004 (annexe I, section 3, chapitre V, alinéa 1) que l'usage de substances chimiques décontaminantes pour les viandes est illégal et que seul le parage est explicitement autorisé (règlement No 853/2004). En effet, il est précisé que « les viandes doivent être déclarées impropres à la consommation si elles [...] ont été traitées illégalement au moyen de substances décontaminantes » et qu'elles doivent être retirées de la chaîne.

La législation européenne reste donc ambiguë sur certains points concernant les actions correctives autorisées des viandes contaminées. Le règlement 853/2004 (point 2 article 3) précise que « les exploitants du secteur alimentaire n'utilisent aucune substance autre que l'eau potable, [...] pour éliminer la contamination de surface des produits d'origine animale, sauf si l'utilisation de cette substance a été approuvée conformément à la procédure visée à l'article 12, paragraphe 2 ». Dans ce texte, la législation européenne envisage d'une part la possibilité d'une décontamination de surface des produits, ce qui paraît contradictoire avec le précédent règlement. Il autorise, d'autre part, l'utilisation d'eau potable mais ne précise pas sous quelle forme (vapeur, chauffée, gel...) et donc laisse une certaine liberté quant à son utilisation. Or, nous verrons que plusieurs procédés de décontamination utilisent uniquement de l'eau soumise à des conditions physiques particulières. Par ailleurs, la référence à l'article 12 (qui est en fait une référence aux articles 5 et 7 du règlement 1999/468/CE sur les modalités de l'exercice des compétences d'exécution conférées à la Commission) laisse la liberté à la Commission de soumettre de nouveaux projets autorisant l'utilisation d'autres substances. La Commission se réserve donc le droit d'autoriser d'autres méthodes de décontamination des surfaces et rien de réglementaire ne semble interdire les méthodes de décontamination à base d'eau.

Ainsi, l'utilisation de douchettes à l'abattoir, visant à asperger d'eau potable à température ambiante une surface plus ou moins grande de la carcasse et/ou du matériel, est fréquemment rapportée (communication personnelle des Services Vétérinaires et observations en abattoir). Elle est interdite en vertu de l'article 16 de l'arrêté ministériel du 17 mars 1992 corrigé par celui du 18 janvier 2008 qui précise qu'« il est interdit ...de nettoyer ces viandes à l'aide d'un linge ou d'autres matériaux » , « le douchage de la carcasse est utilisé immédiatement après la fente pour éliminer les esquilles osseuses et les caillots de sang. Toutes précautions doivent être prises pour éviter des éclaboussures des carcasses par de l'eau souillée. Le douchage final des carcasses après inspection est autorisé s'il est effectué en cabine, ainsi que le douchage des carcasses de porcs après brûlage. L'utilisation des douchettes à d'autres fins est interdite, à l'exception du nettoyage du tablier dans les conditions prévues au cinquième alinéa de l'article 6. ». Aucune donnée évaluant ce procédé n'est disponible et son utilisation illégale soulève des interrogations parmi les Services Vétérinaires : quelles peuvent être les conséquences de son utilisation suite à une erreur d'éviscération, notamment en matière de dispersion de la contamination ?

La réglementation européenne met en place les principes de base régissant l'hygiène en abattoir, et, de ce fait, ceux concernant la contamination des viandes. Si elle permet l'utilisation de méthodes correctives, elle spécifie avant tout que la contamination doit être évitée par la mise en place d'un plan de prévention adapté.

### 3.3 Maîtrise de la contamination d'origine digestive des viandes par une approche préventive et des pratiques raisonnées

Dans le cadre du Paquet Hygiène, les abattoirs sont donc soumis à des règles d'hygiène générale qui ont pour objectif d'assurer la sécurité et la salubrité des viandes produites. Le Paquet Hygiène met l'accent sur des pratiques raisonnées et des dangers maîtrisés tout au long de la chaîne de production alimentaire. Pour lutter contre les dangers, il recommande et impose les actions préventives plutôt que des actions correctives. Nous nous proposons d'en aborder certains aspects dans ce paragraphe.

#### 3.3.1 Guides des Bonnes Pratiques d'Hygiène (GBPH), plan Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) et Plan de Maîtrise Sanitaire (PMS).

La création des GBPH a été encouragée par le règlement 852/2004. Ils sont rédigés par les professionnels d'un secteur agro-alimentaire puis validés par les pouvoirs publics, et ensuite publiés au Journal Officiel. La plupart des guides pour l'abattage et la découpe sont encore en cours de validation et ne sont donc pas publiés. Ils peuvent néanmoins servir de référence temporaire s'ils ont été validés par l'administration. Ils décrivent le processus de fabrication d'une denrée et proposent des mesures non spécifiques à un danger permettant de garantir l'Hygiène (sécurité et salubrité) des aliments. Ils comportent des opérations dont les conséquences sur le produit fini ne sont pas mesurables. En ce qui concerne l'abattage, il précise les mesures d'hygiène non spécifiques à un danger mais diminuant le risque général de contamination. Par exemple, il mentionne l'hygiène et le suivi médical du personnel, la séparation du secteur propre et du secteur souillé, les modalités du nettoyage et de la désinfection, le plan de lutte contre les nuisibles... (3). Remarquons que cette démarche commence dès l'élevage ou les bonnes pratiques tentent de diminuer la prévalence de certains pathogènes (règlement 2160/2003 dépistage des Salmonelles pour volailles et porcs).

Ces guides s'appuient, pour leur construction, sur l'identification générale des causes de la contamination en abattoir, à partir de la méthode classiquement utilisée en hygiène des aliments, la méthode des 5 M (Matériel, Méthode, Main d'œuvre, Milieu, Matière). Ces causes sont aujourd'hui, comme nous l'avons vu en partie 1.3.1 et sur la Figure 4, assez bien décrites pour les opérations unitaires du procédé présentant le plus de risque pour le transfert des dangers (Figure 4). Les grandes notions abordées dans le GBPH, pour les abattoirs de bovins sont précisées en Annexe B. Pour les principales étapes à risques de contamination digestive (éviscération et ligatures), nous avons donné un exemple de Bonne Pratique d'Hygiène associée (BPH) (Tableaux III). Les BPH liées aux étapes à risque de contamination cutanée sont détaillées en annexe B.

Les BPH sont des pré-requis indispensables dont le respect scrupuleux conditionne l'efficacité du plan HACCP. Dans ces guides, la base du plan HACCP est mise en place, les étapes à risque pour certains dangers et les moyens visant à diminuer le risque sont précisées (3, 78).

Tableaux III : Causes spécifiques d'apparition du danger et mesures de maîtrise, pour des étapes propices à une contamination primaire.

#### Ligature de l'œsophage

Origine	Causes	Mesures préventives
<b>Méthode</b>	– Ecoulement du contenu stomacal suite à une mauvaise ligature de l'herbière ou en coupant l'œsophage	– Précaution gestuelle – Opérateur expérimenté – Effectuer une ligature correcte – Ne pas couper l'œsophage
<b>Main d'œuvre</b>		

*Détourage et ligature (ou ensachage du rectum)*

Origine	Causes	Mesures préventives
<b>Méthodes</b>  <b>Main d'œuvre</b>	- Mauvaise ligature	- Opérateur expérimenté - Précaution gestuelle : découpage circulaire minimal
	- Viande touchée par la lame utilisée pour dégager le rectum	
	- Rectum coupé	

*Parfente abdominale*

Origine	Causes	Mesures préventives
<b>Matières premières</b>	- Présence d'un abcès ou de lésions	- Avertir le service d'inspection - Parage autour de l'abcès ou de la lésion et évacuation rapide du morceau atteint - Arrêt de la préparation si la lésion est trop étendue
<b>Méthodes</b>  <b>Main d'œuvre</b>	- Incision accidentelle des viscères	- Précaution gestuelle - Opérateur expérimenté - Ouverture de l'abdomen de haut en bas, manche à l'intérieur, pointe du couteau vers le bas - Utiliser un couteau à boule

*Eviscération*

Origine	Causes	Mesure préventives
<b>Matière première</b>	- Présence d'abcès, de lésions importantes, étendues ou purulentes	- Arrêt de la préparation - Avertir le service d'inspection
<b>Méthode</b>  <b>Main d'œuvre</b>	- Perforation des intestins	- Précaution gestuelle - Opérateur expérimenté - Pratiquer l'éviscération abdominale en une seule étape : ne pas séparer boyaux et estomac dans la carcasse, mais les éliminer en même temps
	- Perforation du rumen	- Ne pas couper l'œsophage, l'éliminer avec sa ligature en le pinçant pour éviter tout risque d'écoulement
	- Essaimage bactérien	- La durée entre l'étourdissement et l'éviscération ne doit pas excéder 45 minutes - Echelonner les départs en pause pour qu'il ne reste sur la chaîne aucun animal non éviscéré

Pour chaque étape à risque ou qui nécessite une attention particulière, il existe une recommandation du GBPH ou un point de contrôle du HACCP.

La méthode HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points ; Analyse des dangers - Points critiques pour leur maîtrise) fut élaborée à la fin des années soixante par Pillsbury, une entreprise américaine fournissant à la NASA (National Aeronautics and Space Administration) l'alimentation des cosmonautes. Il s'agit d'un système qui identifie, évalue et maîtrise les dangers significatifs au regard de la sécurité des aliments (NF V01-002). Il est abordé dans la directive 93/43 et dans le règlement 852/2004 (article 5).

Cette méthode obligatoire est basée sur sept principes (Annexe B) définis par le Codex Alimentarius dont l'analyse des dangers et la détermination des points critiques pour leur maîtrise (33). La mise en œuvre à l'abattoir, en respectant ces sept principes se décompose en douze étapes successives groupables en quatre phases (Tableau IV) :

Tableau IV : Les 12 étapes de la mise en œuvre de l'HACCP en abattoir.

Description des paramètres de la production	1. Constituer une équipe HACCP
	2. Décrire le produit
	3. Identifier l'utilisation attendue
	4. Construire un diagramme de fabrication
	5. Vérifier sur place le diagramme de fabrication
Analyse des dangers et identification des points critiques	6. Lister tous les dangers potentiels Effectuer une analyse des risques et des causes Déterminer les mesures préventives
	7. Déterminer les CCP (Critical Control Point)
Surveillance des CCP et actions correctives	8. Etablir les limites critiques pour chaque CCP
	9. Etablir un système de surveillance pour chaque CCP
	10. Etablir des actions correctives pour les déviations qui peuvent survenir
Vérification du système HACCP	11. Etablir des procédures de vérification
	12. Etablir un système d'enregistrement et de documentation

Contrairement aux GBPH qui sont communes à un type de production, chaque plan HACCP est hautement spécifique de l'atelier dans lequel il est réalisé. Il sera donc différent d'un abattoir à un autre (27). Les dangers considérés sont principalement les bactéries pathogènes qui peuvent contaminer la viande. Ces dangers peuvent résulter d'une contamination primaire provenant du tractus intestinal ou de la peau des animaux ou d'une contamination secondaire via le matériel ou le personnel. Pour les identifier à chaque étape de la production, nous pouvons utiliser la règle des 5 M. Des exemples de causes d'apparition de dangers ont été abordés dans le paragraphe sur les GBPH.

Les CCP ou points de maîtrise essentiels sont les étapes qu'il est indispensable de contrôler pour assurer la sécurité du produit fini. On détermine pour ces étapes des limites critiques (valeurs numériques ou critères opérationnels), séparant l'acceptable de l'inacceptable et des actions correctives. Leur surveillance est continue.

Par exemple, l'éviscération abdominale est une étape d'abattage pour laquelle toute erreur de manipulation entraîne une contamination immédiate et importante de la carcasse : c'est un CCP (111). Les limites critiques pour cette étape sont souvent des critères opérationnels (aspects visuels : projection de contenu digestif). L'opérateur sur la chaîne surveille de façon continue la qualité de son travail et alerte, en cas de dépassement des limites critiques.

Les actions correctives sont de deux types (Tableau V) :

- Immédiates : identification de la cause et traitement des carcasses souillées
- Différées : formation du personnel au poste, hygiène,...

Tableau V : limites critiques et actions correctives du CCP éviscération abdominale (d'après 111)

Causes	Limites critiques	Actions correctives
- Perforation des intestins ou du rumen	- Carcasse souillée	- Parage, ( <i>Douchage</i> *) - Consigne éventuelle - Formation complémentaire ou changement de poste si nécessaire
- Essaimage bactérien	- Délai entre la saignée et l'éviscération inférieur à 45 minutes	- Avertir le service d'inspection - Sanction disciplinaire - Réparation de la chaîne d'abattage si nécessaire - Consigne et saisie éventuelle des carcasses concernée

\*normalement interdit en France

Pour chaque étape à risque lors de l'abattage, il existe une BPH ou un CCP. La mise en place de ces mesures préventives en abattoir est obligatoire et coordonnées par la création à l'échelle de l'entreprise d'un plan de maîtrise sanitaire.

La mise en place d'un Plan de Maîtrise Sanitaire est obligatoire pour les établissements dont l'activité est soumise à un agrément, donc *a fortiori* les abattoirs. Il s'agit d'un ensemble de documents demandés par les services vétérinaires décrivant les mesures prises par l'établissement pour assurer l'hygiène et la sécurité sanitaire de ses productions vis-à-vis des dangers biologiques, physiques et chimiques. Il comprend : les GBPH, le plan HACCP, la gestion des produits non-conformes (procédure de retrait rappel), et la mise en place d'un système de traçabilité.

### 3.3.2 Les critères microbiologiques

Les critères microbiologiques « définissent l'acceptabilité d'un produit, d'un lot de denrées alimentaires ou d'un procédé, sur l'absence, la présence ou le nombre de microorganismes, et/ou de la quantité de leurs toxines/métabolites, par unités de masse, volume, surface ou lot ». Le règlement 2073/2005 rattaché au règlement 854/2004, introduit ces critères comme une partie intégrante du plan HACCP et des autres mesures de contrôle de l'Hygiène. Il précise que « Les critères microbiologiques peuvent servir pour la validation et les vérifications des procédures fondées sur les principes HACCP et des autres mesures de contrôle de l'hygiène ». Ces critères sont définis, si et seulement si, il n'y a pas d'autres outils disponibles pour maîtriser le danger et quand cela améliore le niveau de protection du consommateur. En effet, le règlement précise bien que « La sécurité des denrées alimentaires est principalement assurée par une approche préventive telle que la mise en œuvre de Bonnes Pratiques d'Hygiène et de fabrication et l'application des principes HACCP ». Ces critères définissent un niveau d'« acceptabilité des procédés » et « de sécurité microbiologique fixant une limite au-delà de laquelle on doit considérer qu'une denrée est contaminée de manière inacceptable par les microorganismes pour lesquels les critères sont établis ». Un critère est défini pour un produit donné, un microorganisme donné, et caractérisé par un plan d'échantillonnage, une méthode d'analyse, des limites, un stade d'application et une conduite à tenir.

Ces critères sont établis par le règlement 2073/2005 (annexe I) mais une certaine latitude est laissée aux exploitants pour mettre en place l'échantillonnage. On distingue les critères d'hygiène du procédé, indicateur de la qualité hygiénique du process, applicable à des denrées qui ne sont pas mises sur le marché et correspondant à une valeur de contamination et les critères de sécurité des denrées, qui concerne la sécurité d'un produit prêt à être mis sur le marché. Concernant les carcasses, on utilisera des critères d'hygiène (Tableau VI) et concernant la viande hachée par exemple, ce sont les critères de sécurité qui seront retenus (annexe B).

Tableau VI : Critères d'hygiène des procédés pour les viandes et produits à base de viande, d'après le règlement 2073/2005.

Catégorie de carcasses	Bovins		Porcins		Volailles	
	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum
Microorganismes (log)						
Nombre de colonies aérobies	3,5	5,0	4,0	5,0	-	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,5	2,5	2,0	3,0	-	-
<i>Salmonella</i>	Absence		Absence		Absence dans 25g d'un échantillon groupé de peau du cou	

Pour les bovins et les porcins, les flores surveillées sont les bactéries aérobies, les *Enterobacteriaceae* et les Salmonelles. Les contrôles sont alors réalisés après l'habillage et avant le ressuage. Pour les volailles, sont uniquement contrôlées les Salmonelles après le ressuage. Le choix de ces flores en tant qu'indicateur de la contamination digestive (dite aussi « fécale ») est discutable. En effet, les Salmonelles, si elles sont bien d'origine digestive, ont une prévalence chez l'animal égale à 31% chez le porc (51), 3% chez les bovins (106), 9% des troupeaux de poulets de chair en France (1). Leur portage chez l'animal est donc relativement faible. Par ailleurs, il existe un portage possible chez l'Homme et elles survivent parfois très longtemps dans l'environnement (21). Par conséquent, leur présence sur une carcasse ne prouvera pas forcément une contamination d'origine digestive, et leur absence ne peut en aucun cas exclure une contamination digestive. Les *Enterobacteriaceae* constituent l'une des plus importantes familles de bactéries : elle regroupe de nombreux genres, pathogènes (*E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*) ou non (*Proteus*, *Serratia*). Ces bactéries sont très ubiquitaires pour l'identification d'une contamination d'origine strictement digestive.

### 3.3.3 L'inspection sanitaire des viandes

La détection sur carcasses des dangers peut s'appuyer sur des examens microbiologiques, mais une détection/suspicion indirecte de leur présence à l'aide d'indicateurs lésionnels macroscopiques est une étape nécessaire et complémentaire. De ce fait, l'inspection sanitaire vétérinaire des viandes constitue la base historique de la réglementation relative à l'hygiène des produits carnés. Elle relève d'un service d'Etat d'hygiène alimentaire institué par la loi du 8 juillet 1965 et inscrit aux articles L.231-1 à L.231-6 du Code Rural. Il s'agit d'un examen macroscopique visuel parfois suivis d'examens complémentaires, de palpations et d'incisions des carcasses et des abats destinés à vérifier la salubrité des viandes. Trois issues sont possibles : la saisie, totale ou partielle, si la pièce inspectée est non-conforme, la consigne, en attente de résultats permettant de classer la carcasse et enfin le retour sur la chaîne si la pièce est désignée conforme. L'inspection est un point important de maîtrise de la contamination d'origine digestive, puisqu'elle peut permettre de détecter une souillure digestive visible macroscopiquement. Par contre, si la souillure est peu étendue ou si elle a été corrigée par un rinçage à la douche, et est alors invisible macroscopiquement, l'inspection vétérinaire ne décèlera pas cette contamination. Les indicateurs macroscopiques ont donc une limite certaine quant à la détection des contaminations digestive et plus généralement à la détection de la présence de dangers. Fosse et ses collaborateurs montrent d'ailleurs que la corrélation entre les saisies sanitaires (basée sur des indicateurs macroscopiques) et la prévalence de cinq dangers sur carcasses de porcs (*Campylobacter* spp., *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*) est faible (53). Il est donc indispensable d'y associer d'autres indicateurs.

La question qui se pose est de savoir si ces démarches préventives permettent de maintenir un niveau élevé de protection des consommateurs ou si elles doivent être associées à des actions correctives. Nous allons maintenant envisager une synthèse des résultats des essais scientifiques de décontamination et de considérer l'importance de leur utilisation.

### 3.4 Maîtrise de la contamination d'origine digestive des viandes par des traitements de « décontamination »

Dans les années 1990, de nombreux essais ont été menés sur des méthodes correctives de la contamination bactérienne. Les procédés de décontamination des viandes sont, rappelons le, interdits à ce jour dans l'UE. Aux Etats-Unis, ils sont au contraire utilisés en routine. En effet, depuis 1996, l'USDA-FSIS (United States Department of Agriculture – Food Safety and Inspection Service) reconnaît même officiellement qu'une étape de décontamination doit faire partie du processus d'abattage (154). De nombreux essais scientifiques sont conduits dans le but d'évaluer de nouvelles méthodes de décontamination. Il en existe deux grands types : celles visant à diminuer la

contamination du cuir ou de la peau et celles visant à diminuer la contamination de la carcasse. Ces interventions diffèrent, bien sûr, selon l'espèce, puisque certaines sont abattues avec peau et d'autres sans. Bien que le cuir puisse être un intermédiaire dans le transfert des bactéries du tube digestif vers les masses musculaires, nous ne détaillerons pas ici ses méthodes de décontamination. En effet, notre problématique cible plus particulièrement la contamination directe des masses musculaires par du contenu digestif.

Les méthodes de décontamination de la carcasse se divisent en trois grandes catégories :

- mécaniques : elles visent à ôter le contaminant de la carcasse soit par une exérèse de la partie souillée, le parage, soit par une action décapante, comme lors de l'application d'eau sous pression sur la carcasse.
- chimiques : elles consistent en l'utilisation de composés chimiques qui ont une action antibactérienne propre.
- physiques : elles sont surtout thermiques chaudes et elles associent souvent un procédé mécanique de pulvérisation d'eau sous plus ou moins haute pression.

Les méthodes physiques s'inspirent des traitements thermiques chauds de conservation visant à un effet proche de la « pasteurisation »

- soit par mise en contact des bactéries avec de l'eau chaude (> 57°C et jusqu'à 95° suivant les études) : ce sont les méthodes d'immersion, de douchage, rinçage à l'eau chaude
- soit par projection de vapeur d'eau chaude

Un traitement doit être décrit en termes de paramètres d'action (pression, température) et de temps d'action.

Dans la plupart des essais, les effets de la méthode de décontamination sont évalués grâce à la flore mésophile totale ou à des bactéries d'altération (responsables de modification des propriétés organoleptiques du produit, elles ne sont pas pathogènes). Ceci donne une indication des effets potentiels sur la flore pathogène, mais ne constitue en aucun cas une validation de la méthode pour cette dernière. Certaines études s'attachent cependant à évaluer l'effet des traitements décontaminants sur une flore pathogène inoculée. Selon le cadre de l'étude *in vitro* ou *in situ*, les populations bactériennes suivies varient, le suivi de flores pathogènes inoculées étant délicat *in situ*.

### 3.4.1 Procédés mécaniques

Le parage (découpe d'une partie de la carcasse) est la seule mesure qui répond clairement à la réglementation européenne en matière de correction des contaminations. Dans les abattoirs français, il est surtout utilisé lors de l'inspection *post mortem* par les techniciens des Services Vétérinaires. Il est peu utilisé outre-Atlantique, ou s'il l'est, c'est accompagné d'un autre procédé de décontamination. Très peu d'études sont disponibles sur l'efficacité du parage. Seules des études comparatives du parage combiné à d'autres traitements de décontamination peuvent être rapportées (23, 71). Comparé aux méthodes chimiques ou physiques, le parage est présenté comme pouvant être à l'origine d'une dissémination de la contamination. Pour être efficace, le parage doit bien sûr être réalisé de façon large avec un couteau propre (c'est-à-dire en respectant les BPH).

Le parage présente par ailleurs deux inconvénients à sa mise en œuvre en routine par les industriels :

- la difficulté technique de réalisation : il n'existe pas vraiment de cadre technique connu. Aucune étude ne précise quelle doit en être l'épaisseur ou l'étendue optimale. Le parage en face interne de la carcasse est très délicat en raison de la proximité avec des structures osseuses.

- La perte économique qu'il entraîne : le retrait d'une partie de la carcasse est à l'origine d'une perte de poids, ce qui est économiquement défavorable pour les exploitants.

Interdit en France, le rinçage ou douchage, d'une partie de la carcasse ou de la carcasse entière, utilisant de l'eau à température ambiante, est un autre procédé mécanique. Son utilisation est tolérée en fin de chaîne, avant le ressuage : sous couvert d'accélérer les transferts thermiques, il limite surtout les pertes d'eau de la carcasse (diminution de poids). Aucune étude n'évalue l'efficacité de l'arrosage d'eau à basse pression (2 à 3 bars) et à température ambiante sur la diminution de la charge bactérienne. Quelques rares références traitent de l'utilisation d'eau froide sous pression. Kelly et ses collaborateurs montrent que l'aspersion d'eau à 10°C, à 5,6 bars et 7,7 bars entraîne une diminution respective de la flore totale de 0,4 et 0,5 log sur des carcasses d'agneaux (87). Ils montrent que lors de l'utilisation d'eau à 3,5 bars, l'effet n'est pas significatif. Une autre étude montre que de l'aspersion d'eau à 35°C à une pression de 17 à 27 bars sur des carcasses de bovins conduit à une diminution de la flore totale, des *Salmonelles* ou d'*E. coli* inoculés de 2 log (23). L'eau froide semble présenter une efficacité mécanique réelle sur l'adhésion des bactéries si elle est utilisée à forte pression. Néanmoins, ces études n'évaluent pas la dispersion des bactéries faisant suite à l'utilisation d'un tel traitement. Cette question se pose puisque les bactéries ne sont pas éliminées mais uniquement détachées de leur support.

### **3.4.2 Procédés physiques**

Ces procédés physiques utilisent de l'eau chauffée à différentes températures et pressions, et combinent à la fois un effet physique et un effet mécanique.

#### **3.4.2.1 Immersion, pulvérisation ou rinçage à l'eau chaude**

L'USDA-FSIS reconnaît l'utilisation de l'eau chaude (>57°C) pour la décontamination des carcasses en 1996 (154). Selon les essais, ce traitement présente des effets variables sur la flore bactérienne, selon le délai d'adhésion des bactéries, la nature plus ou moins grasse du muscle, et d'autres facteurs relatifs aux microorganismes étudiés. La pulvérisation d'eau chaude présente à la fois un effet mécanique sur les bactéries (détachement) et physique (température). Pour les deux autres méthodes d'utilisation (rinçage et immersion), la température est le principal mode d'action.

Nous avons synthétisé les résultats de quelques études sur cette technique de décontamination (Tableau VII).

Tableau VII : Tableau de synthèse d'essais expérimentaux évaluant l'efficacité microbologique du traitement à l'eau chaude de carcasses ou de parties de carcasses

Technique utilisée	Espèce	Pièce	N	Date Réf.	Modalités	Flore étudiée	t s	P bar	T °C	Diminution observée (log ufc/cm <sup>2</sup> sauf [153] log ufc/g)
Pulvérisation d'eau chaude	Agneaux	Carcasse Face externe	NR	1981 (87)	Flore présente avant/après traitement	Flore mésophile totale à NR	30	3,5	37	<b>0,5</b>
								5,6		<b>0,5</b>
								7,7		<b>0,7</b>
								65	<b>0,7</b>	
								80	<b>1,1</b>	
Pulvérisation d'eau chaude	Gros bovins	Carcasse Face externe	NR	1993 (5)	Flore présente avant/après traitement	Flore mésophile totale à NR	10	NR	95	Avant douche final : <b>1,3</b> Après douche final : <b>0,8</b>
Pulvérisation d'eau chaude	Gros bovins	Tissu adipeux de poitrine	9	1995 (71)	Flore présente avant/après traitement	<i>E. coli</i> ATCC11370 Flore mésophile totale à 37°C	12	6,89	66	<b>1,3</b>
										<b>1,5</b>
								12	6,89	74
								74	<b>0,98</b>	
								20,68	74	<b>2,2</b> <b>1,92</b>
Pulvérisation d'eau chaude 12,5 cm	Bovins	Carcasses 3 sites Face externe	30	1997 (23)	Flore présente avant/après traitement	<i>Salmonella typhimurium</i> (inoculé) <i>E. coli</i> O157:H7 (inoculé) Coliformes totaux Coliformes thermotolérants	5	1,65	95	<b>4,2</b> <b>4,0</b> <b>4,0</b> <b>3,9</b>
Immersion dans de l'eau	Agneaux	Carcasse 2 sites (pool) Face externe	26 8T	1999 (80)	Traités/Témoins	Flore mésophile totale à 30°C	8	2,3	90	<b>1,09</b>
Aspersion d'eau	Porcs	Carcasse 4 sites (pool) Face externe	800 100T	1995 (65)	Traités/ Témoins	Flore mésophile totale à 25°C	40	NR	80	<b>1,8</b>
										<b>2,6</b>
								40	NR	85
								90	<b>2,7</b>	

N : nombre d'échantillons ; Réf. : référence bibliographique ; t : temps de traitement en s ; P : pression de l'eau utilisée en bar ; T : température de l'eau

Tableau VII (Suite)

Technique utilisée	Espèce	Pièce	N	Date Réf.	Modalités	Flore étudiée	t (s)	P (bar)	T (°C)	Diminution observée (log ufc/cm <sup>2</sup> sauf [153] log ufc/g)
Immersion dans de l'eau	Poulet	Peau Cuisse	60 10T	2002 (166)	Traités/Témoins	Flore mésophile totale à 37°C	10	-	75 80 85	Non significative <b>1,09</b> <b>1,25</b>
						<i>Campylobacter jejuni</i> (présent) et <i>Enterobacteriaceae</i>	10	-	75 80 85	Non significative Non significative Non significative
						<i>Campylobacter</i> inoculé	10		75 80 85	<b>0,92</b> <b>0,84</b> <b>1,08</b>
Immersion dans l'eau chaude	Poulets	Peau Cuisse		2002 (166)	Traités/Témoins	Flore mésophile totale à 37°C	20		75 80 85	Non significative <b>1,37</b> <b>1,37</b>
						<i>Enterobacteriaceae</i>	20	-	75 80 85	Non significative <b>0,84</b> <b>0,98</b>
						<i>Campylobacter jejuni</i> (présent)	20	-	75 80 85	Non significative <b>0,97</b> <b>1,25</b>
Immersion dans de l'eau chaude	Poulets	Bréchets avec peau	15 5T	2000 (70)	Traités/Témoins	<i>E. coli</i> O80 (inoculé)	2	-	90	Non significative
							60	-	60	Non significative

N : nombre d'échantillons ; Réf. : référence bibliographique ; t : temps de traitement en s ; P : pression de l'eau utilisée en bar ; T : température de l'eau

Pour les carcasses de bovins, beaucoup d'études ont été réalisées sur la flore mésophile totale et montre une diminution de celle-ci de 1 à 3 log/cm<sup>2</sup>. Les résultats des études réalisées sur flore pathogène ont en revanche des résultats très variables.

Pour les volailles, l'efficacité de la décontamination dépend de la flore étudiée. Il faut remarquer qu'une immersion dans de l'eau à plus de 75 °C, même sur une durée de 10 s ou 20 s, donne un aspect « cuit » à la carcasse et entraîne une dépréciation organoleptique du produit (166). Or une immersion dans de l'eau à moins de 75 °C n'a aucun effet significatif sur les flores bactériennes. Ce traitement à l'eau chaude ne peut donc pas combiner une réduction significative de la flore et la préservation des qualités commerciales du produit. Des résultats concordants ont été obtenus dans d'autres études (11, 70). Goksoy et ses collaborateurs sélectionnent dans leur étude des couples temps/température pour l'immersion de bréchets recouverts de peau de sorte que l'aspect visuel soit préservé. Aucun de ces couples temps/température ne conduit à une réduction significative de la flore inoculée d'*E. coli*. D'un point de vue commercial, cette technique ne peut être adoptée par les entreprises étant donné la dénaturation provoquée du produit et l'impact potentiel sur le comportement du consommateur.

Même si son efficacité bactériologique a été démontrée sur la flore totale, l'utilisation d'un tel traitement est peu fréquente en pratique du fait des défauts organoleptiques qu'il entraîne et ce quelle que soit l'espèce (76).

#### **3.4.2.2 Utilisation de la vapeur**

La vapeur d'eau peut être utilisée à plus ou moins haute pression. Son utilisation comme moyen de décontamination est autorisé officiellement depuis 1996 aux Etats-Unis (154). La vapeur d'eau est pulvérisée sur les carcasses à la fin de la chaîne d'abattage. Le mécanisme d'action de la vapeur d'eau sur la flore bactérienne est à la fois mécanique (lessivage) et physique (hausse de température) (15). Ses avantages par rapport à l'eau sous forme liquide sont l'efficacité du transfert de chaleur, une faible quantité de résidus, et un effet mécanique accentué. La plupart du temps ce traitement à la vapeur est précédé par une aspiration de l'eau et suivi d'une aspersion d'eau froide pour prévenir la cuisson de la viande (124).

Nous avons synthétisé les résultats de quelques études portant sur cette technique :

Tableau VIII : Tableau de synthèse d'essais expérimentaux évaluant l'efficacité microbologique du traitement à la vapeur de carcasses ou de parties de carcasses

Technique utilisée	Espèces	Pièce Sites de prélèvement	N	Date Réf.	Modalités	Flore étudiée	t s	P bar	T °C	Diminution observée (log ufc/cm <sup>2</sup> )
Pulvérisation vapeur d'eau	de Gros bovins	Carcasses Face externe 5 sites	200	1998 (124)	Traités/ Témoins	Flore mésophile totale à 35°C	6,5	NR	82,2	Entre <b>0,4</b> et <b>1,3</b>
						<i>E. coli</i>				Pour les carcasses positives : <b>0,5</b>
Pulvérisation vapeur d'eau	de Agneaux	Carcasses Face externe 2 sites (pool)	26 8T	2000 (80)	Traités/ Témoins	Flore mésophile totale à 30°C	8	5	NR	<b>1,06</b>
Pulvérisation vapeur d'eau	de Poulets	Carcasses 1 site (Peau de cuisse)	20 10T	2002 (166)	Traités/ Témoins	Flore mésophile totale à 37°C <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Campylobacter</i>	12	NR	90	Non significative
Pulvérisation vapeur d'eau	de Poulets	Carcasses 1 site (Peau de cuisse)	20 10T	2002 (166)	Traités/ Témoins	Flore mésophile totale à 37°C	24	NR	90	<b>0,75</b>
						<i>Enterobacteriaceae</i>				<b>0,69</b>
						<i>Campylobacter thermotolérants</i>				<b>1,3</b>
Pulvérisation vapeur d'eau	de Poulets	Blancs recouvert de peaux 2 sites	30	2000 (79)	Flore présente avant/après traitement	<i>E. coli</i> 080	6 8 10	5	90-100	<b>0,55 à 1,5</b> <b>1,2 à 1,9</b> <b>1,2 à 1,8</b>
						Flore mésophile totale à 37°C	10			<b>1,65</b>
Pulvérisation vapeur d'eau	de Poulets	Demi-carcasses	20 20T	2000 (93)	Traités/ Témoins	Flore mésophile totale à 37°C	0,1	NR	138	<b>0,8</b>
							0,2		144	Non significative
Pulvérisation vapeur d'eau	de Poulets	Morceaux de blancs	9	1996 (117)	Traités/ Témoins	Coliformes totaux	18* 52ms		129	<b>0,4</b>
						<i>E. coli</i>				<b>0,4</b>
						<i>Listeria innocua</i> (non pathogène mais thermorésistante)				<b>3</b>

N : nombre d'échantillons ; Réf. : référence bibliographique ; t : temps de traitement en s ; P : pression de l'eau utilisée en bar ; T : température de l'eau

Pour les carcasses de volailles, une exposition de 24 s à une vapeur à 90°C (surpression) est nécessaire pour observer une diminution des campylobacters thermotolérants. D'autres études aboutissent à des résultats similaires en matière de réduction de flore bactérienne mais font état d'une différence entre l'efficacité du traitement à l'extérieur et à l'intérieur de la carcasse. La cavité interne de la carcasse est moins bien décontaminée. Par ailleurs, ces traitements provoquent une altération de la peau : décoloration, crevasses, apparition d'une pigmentation jaune, aspect « desséché » (80, 166).

Concernant les effets du traitement sur la couleur de la viande, ces études montrent qu'un traitement à la vapeur de plus de 15 s entraîne l'apparition d'une coloration grise sur la carcasse, mais après un ressuage de 24 h, la couleur redevient acceptable. Cette méthode est utilisée dans de nombreux abattoirs de bovins aux Etats-Unis.

#### **3.4.2.3 Utilisation de la vapeur suivie d'une aspiration de l'eau ou « steam vacuum »**

Il s'agit d'une variante de l'utilisation de la vapeur décrite par Dorsa (41). La pulvérisation de vapeur sur la carcasse est suivie par une aspiration, ce qui présente un double effet sur la flore : l'inactivation et le détachement. Par ailleurs, cette méthode évite des contaminations secondaires par un ruissellement de l'eau le long de la carcasse (91). L'USDA-FSIS l'a approuvée comme équivalent du parage pour enlever une contamination digestive. Les réductions de flore obtenues avec un tel système varient de 1,1 à 2,3 log cfu/cm<sup>2</sup> pour la flore mésophile totale et de 1,2 à 2,2 log pour les coliformes totaux (90). Dorsa et ses collaborateurs rapportent une diminution de 3 à 4 log pour la flore mésophile totale, les coliformes totaux et les *E. coli*.

Cet outil est utilisé surtout pour la décontamination en fin de chaîne, avant le ressuage. Certains essais ont tenté d'étudier son utilisation pour traiter une contamination localisée, mais aucun résultat concluant n'a été obtenu pour les Salmonelles.

L'introduction de ces procédés sur la chaîne d'abattage implique une maintenance importante : vérification de la température et de la pression de l'eau, de la couverture de la carcasse, et du temps de pulvérisation.

### **3.4.3 Procédés chimiques**

Les procédés chimiques utilisent principalement des acides organiques, mais aussi une grande variété d'autres composés.

Booth (1985) montre que l'introduction d'acide dans le milieu où vivent les bactéries induit une immédiate baisse du pH intracellulaire (16, 140). Dans le milieu extérieur, à pH acide, l'acide organique se dissocie, il y a libération de protons. A la faveur de l'augmentation du gradient de protons transmembranaire (force proton-motrice), les protons libérés traversent la membrane bactérienne via des transporteurs. L'acidification cytoplasmique induit une perturbation du métabolisme cellulaire et peut conduire alors à l'inactivation voire la mort de la bactérie. Leur utilisation classique consiste en un rinçage complet de la carcasse. De nombreuses études ont montré que l'efficacité de ces acides est optimisée lorsqu'ils sont appliqués après l'habillage externe, quand la carcasse est encore chaude ou bien lorsque la solution d'acide est réchauffée (25, 144). L'USDA-FSIS a reconnu officiellement l'utilisation d'acides organiques comme l'acide lactique, l'acide citrique et l'acide acétique (à des concentrations de 1,5 à 2,5%) comme traitement de décontamination (76). Des essais ont aussi été effectués avec le Cetyl-pyridium chloride (CPC), donnant de très fortes réductions de la flore pathogène notamment par application sur le cuir, mais la teneur en résidus n'est pas compatible avec la consommation des viandes ainsi traitées. Le chlorite de sodium (ASC) ou le trisodium

phosphate (TSP) sont deux autres sels d'acides inorganiques couramment utilisés aux Etats-Unis pour décontaminer les carcasses.

L'utilisation de la lactoferrine par pulvérisation a aussi été envisagée (121). Cette glycoprotéine sécrétée par certaines cellules épithéliales dont les cellules de la glande mammaire en lactation et par les cellules de la lignée granulocytaire, a la particularité de piéger le fer, nécessaire à la croissance et au développement de nombreuses bactéries. Elle possède de ce fait une activité bactériostatique. Extraite du lait écrémé ou de lactosérum, cette protéine aurait montré un rôle inhibiteur de l'adhésion, de la croissance bactérienne et de la synthèse d'endotoxine pour plusieurs bactéries pathogènes et d'altération en surface des carcasses. Cette technique coûteuse a été adoptée par l'USDA-FSIS et est actuellement testée aux Etats-Unis.

Nous avons analysé plus en détail sept essais réalisés sur les produits suivants : la carcasse ou le quartier de bovin, la carcasse d'agneau, et la cuisse de poulet (tableau IX). Les bactéries étudiées sont pour la majorité de ces essais, la flore aérobie mésophile à 30°C (quatre essais), les coliformes totaux ou *E. coli* (quatre essais), et enfin *E. coli* O157:H7 pour les viandes bovines (deux essais). Sur la flore aérobie mésophile, les réductions observées varient de 0,33 à 3,3 log UFC/cm<sup>2</sup>, en fonction de la nature de l'acide, de la modalité de l'application et de la viande (pour les cuisses de poulets les réductions observées étant les plus faibles) (8) Les délais de mesures avant et après traitement sont plus long avec ces techniques (jusqu'à plusieurs jours) puisqu'ils continuent d'agir en surface (39). Il apparaît en revanche un risque d'acquisition de résistance des bactéries. En effet, une souche d'*E. coli* O157:H7 résistante à l'acidité a pu être mise en évidence (139).

Tableau IX : Tableau de synthèse de sept essais expérimentaux évaluant l'efficacité des traitements chimiques de carcasses ou de parties de carcasses

Technique utilisée	Espèces	Pièce	N	Date Réf.	Modalités	Flore étudiée	t	P bar	T °C	Diminution observée (log ufc/cm <sup>2</sup> )
Pulvérisation d'acide lactique à 4%	Bovins	Carcasses après ressuage 3 sites Face externe	40	2001 (25)	Traités/ Témoins	Flore mésophile totale à 20°C	35s	NR	55	<b>3,0 à 3,3</b>
						<i>E. coli</i>				Non détectables après traitement
Pulvérisation d'un surfactant suivi d'acide lactique à 2%	Bovins	Quartier et morceaux découverts de graisse	NR	2002 (20)	Traités/ Témoins	<i>E coli</i> 0157 :H7	3j	NR	38 à 46	<b>3,1</b>
Lavage à l'eau additionnée d'acide lactique à 2%	Bovins	Carcasses 3 sites Face externe	30	1997 (23)	Flore présente avant et après traitement	<i>Salmonella typhimurium</i> (inoculée)	11s	2,7	55	<b>4,9</b>
						<i>E. coli</i> 0157 : H7 (inoculée)				<b>4,6</b>
						Coliformes totaux				<b>4,5</b>
						Flore mésophile totale à 35°C				<b>4,6</b>
Pulvérisation de chlorite de sodium associé à de l'acide phosphorique	Bovins	Carcasses 5 sites Face externe	4	1999 (24)	Flore présente avant et après traitement	<i>E coli</i> 0157 : H7	10s	6,9	22 à 25	<b>3,9</b>
						<i>Salmonella typhimurium</i> inoculés				<b>4,6</b>
Pulvérisation d'acide citrique associé à du chlorite de sodium	Bovins	Quartiers avant 1 site	96	1974 (92)	Avant et 45min après traitement	Flore mésophile totale à 35°C	30s	4,2	12,8 51,7	<b>2,7</b>
										24,6
Pulvérisation d'eau chlorée à 200ppm	Bovins	Carcasses 1 site	96	1974 (92)	Avant et 45min après traitement	Flore mésophile totale à 35°C	30s	4,2	12,8 51,7	<b>3,6</b>
										24,6
Pulvérisation d'eau chlorée à 450 µg/mL	Ovins	Carcasses Face externe 2 sites (pool)	26 8T	1981 (87)	Traités/ Témoins	Flore mésophile totale à 30°C	30s 120s	3,5	37	<b>0,93</b>
									80	<b>1,23</b>
									80	<b>1,28</b>
										<b>2,06</b>

Tableau IX : suite

Bain de Trisodiumphosphate à 12%	Poulets	Cuisses Prélèvement de la peau	66 11T	2006 (38)	Traités/ non traités	Flore mésophile totale à 30°C	72h	-	18°C	<b>1,74</b>
						Coliformes totaux				<b>0,93</b>
Flore mésophile totale à 30°C						<b>1,97</b>				
Coliformes totaux						<b>1,40</b>				
Flore mésophile totale à 30°C						<b>0,33</b>				
Coliformes totaux						<b>0,28</b>				
Bain de chlorite de sodium 1200ppm										
Bain de peroxyacide (Inspexx®)										

### 3.4.2 Traitements combinés ou « hurdle technology »

Ces traitements combinent des méthodes physiques et chimiques. Il existe un effet synergique des différents procédés (23). Par exemple, l'utilisation conjointe de vapeur d'eau et d'acide lactique, permet d'associer une action mécanique sur l'adhésion des bactéries et une action désinfectante (130, 131). Les gains de réduction bactérienne sont assez importants 3 à 4 log/cm<sup>2</sup> en moyenne. La diminution de la flore d'altération rallonge la durée de vie du produit, ce qui est un atout économique non négligeable de ces technologies. Un bilan de l'ensemble de ces techniques est présenté en annexe B.

En résumé, nous constatons un manque de données sur l'effet de l'ensemble de ces traitements sur la flore pathogène. La plupart des études portent sur des flores bactériennes ne constituant pas des dangers pour le consommateur (flore mésophile totale, flore d'altération, *Listeria innocua*) et/ou n'étant pas le résultat d'une contamination primaire d'origine digestive (*Listeria monocytogenes* dont le réservoir majeur est l'environnement). D'autres études portent sur des flores pathogènes inoculées, mais les conditions appliquées (temps de contact, population initiale...) ne correspondent pas à celles de la chaîne d'abattage. De plus, ces traitements contribuent à la détérioration organoleptique du produit.

**Pour résumer cette étude bibliographique,**

**Les crises alimentaires font partie des crises sanitaires les plus fréquentes dans les pays développés. Les aliments incriminés sont, pour la majorité des cas, des viandes contaminées, notamment par des dangers bactériens. Or, l'abattage est une étape à risque pour la contamination primaire des viandes, puisque lors du processus d'abattage sont manipulés deux réservoirs naturels de ces dangers : la peau d'une part, et le tube digestif des animaux d'autre part. Les espèces dites de boucherie et notamment les bovins et les porcins ont des procédés d'abattage peu différents quant aux opérations unitaires d'éviscération abdominale, opérations dont il a été montré qu'elles étaient à haut risque vis-à-vis du transfert potentiel des dangers bactériens à réservoir digestif.**

**Parmi les dangers bactériens à réservoir digestif animal, *Campylobacter thermotolerant*, à l'origine de la zoonose bactérienne alimentaire la plus fréquente en Europe, apparaît comme un témoin d'intérêt général pour étudier la contamination primaire d'origine digestive des carcasses. En effet, son réservoir est développé (nombreux animaux et espèces porteurs, niveaux de présence du danger élevés) et spécifique (pas de portage humain, résistance relative faible de la bactérie hors de son réservoir naturel, le tube digestif).**

**Pas ou très peu de données sont disponibles en général sur le comportement des bactéries en surface des carcasses (mobilité, dispersion, pénétration). Or ce comportement semble varier en fonction de nombreux paramètres dont la nature de la matrice carnée (masse musculaire recouverte ou non d'une aponévrose, couenne, ...). Comme nous l'avons vu par ailleurs, les actions correctives d'une contamination d'origine digestive des carcasses, souvent apparentées aux méthodes dites de décontamination, ne sont le plus souvent abordées que sous l'angle de leurs effets sur la flore totale, et non pas, ou très insuffisamment, sous celui des effets sur les dangers bactériens. Enfin, deux pratiques sont fréquemment observées en abattoir, le parage d'une part et l'utilisation de la douchette d'autre part, pour corriger visuellement les souillures d'origine digestive des carcasses. Or ces pratiques ne sont pas évaluées quant à leurs effets au plan microbiologique, notamment pour la gestion des dangers bactériens tels que *Campylobacter*.**

Etude expérimentale

## Introduction

Par notre étude expérimentale, nous nous sommes attachée à rechercher dans quelles proportions les bactéries, et plus particulièrement *Campylobacter*, ayant fait l'objet d'un transfert entre le tube digestif des animaux et la surface des carcasses lors de l'opération de l'éviscération abdominale, sont susceptibles de « diffuser » dans ou sur les matrices carnées contaminées, dans le délai moyen existant sur la chaîne d'abattage entre la contamination et son éventuelle correction. Cette question s'est insérée dans un programme de recherche de l'UMR INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) – ENVN (Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes) – ENITIAA (Ecole Nationale d'Ingénieurs des Techniques des Industries Agricoles et Alimentaires) 1014 SECALIM (SEcurité des ALiments et Microbiologie), sous la direction de Catherine Magras (Pr) et Michel Laroche (CR INRA).

Les grandes questions envisagées sont :

- dans quelle mesure les bactéries déposées en surface sont-elles retenues et/ou migrent-elles en profondeur ? S'il y a pénétration, quelle profondeur peut être atteinte par les bactéries dans le délai moyen pratiqué avant une action corrective ?
- quelles sont les conséquences d'un rinçage à l'eau de la surface contaminée de la carcasse : les bactéries sont-elles lessivées ? Augmente-t-on la surface contaminée par dispersion de la flore bactérienne ?

Une première réponse à ces questions nécessite une approche expérimentale avec l'inoculation d'une quantité connue, la plus standardisée possible, de la bactérie témoin sur les viandes et d'un placebo sur les viandes témoins négatifs. Or, à ce jour, il ne peut être envisagé d'inoculer un agent zoonotique sur la chaîne d'abattage tant du point de vue sanitaire que du point de vue économique. Travailler *in vitro* sur la construction d'un ou plusieurs modèles nous permet en revanche de réaliser un grand nombre d'essais, tout en essayant, par le choix des paramètres du modèle, d'approximer au mieux les conditions correspondant à la chaîne d'abattage. Ma participation à la construction de ce(s) modèle(s) s'est faite sur la période de mars à septembre 2009, correspondant à mon stage de thèse pour l'option de quatrième année, « Médecine des animaux d'élevage et qualité des aliments ».

Nous avons envisagé deux modèles différents de la contamination d'origine digestive des viandes en utilisant comme témoin *Campylobacter* thermotolérant. Un premier modèle étudie la pénétration en profondeur des bactéries et le second, les conséquences d'un lavage à l'eau, représentatif d'un douchage après souillure.

Ces modèles ont été développés sur trois types de matrices : i) la viande, masse musculaire, recouverte d'un tissu conjonctif, ii) la viande, masse musculaire non recouverte d'un conjonctif et enfin, iii) la couenne considérée réglementairement comme une viande.

# 1. Matériels et méthodes

## 1.1 Paramètres de base des deux modèles expérimentaux,

D'importants essais préparatoires à la conception de notre modèle ont été nécessaires. Les résultats obtenus lors de ces essais, que nous ne détaillerons pas, nous impose d'envisager deux modèles expérimentaux distincts, au lieu d'un seul envisagé initialement. Voulant étudier la contamination d'origine digestive des carcasses sous deux angles, d'une part celui de la migration en profondeur des bactéries et d'autre part celui de leur dispersion consécutive au rinçage à l'eau, il nous a été techniquement nécessaire de concevoir deux modèles distincts, que nous intitulerons :

- le modèle « Pénétration »
- le modèle « Dispersion ».

Le danger *Campylobacter*, bactérie témoin retenue pour les raisons précédemment évoquées est inoculé à la surface des viandes testées. Or, la forte diversité des souches de *Campylobacter* observée sur les viandes quelle que soit l'espèce et les récents résultats de l'UMR 1014 sur les capacités d'adhésion de *Campylobacter* aux surfaces inertes (149) amène à prendre en considération un éventuel effet espèce et souche bactérienne sur les capacités de *Campylobacter* à persister en surface des viandes contaminées. Nous avons testé deux souches des deux principales espèces *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli*.

Nous avons choisi de travailler sur « viande » non stérilisée, afin de ne pas risquer de modifier les caractéristiques physico-chimiques de la matrice. De ce fait, il existe une flore mésophile totale présente sur les viandes testées avant leur inoculation avec *Campylobacter*. Nous avons par conséquent évalué le comportement de cette flore mésophile en parallèle de celui de *Campylobacter*.

Le comportement des bactéries est étudié sur trois « viandes » dont la nature histologique est différente, et que l'on nomme « matrices » dans la suite de cet exposé. Selon les modalités de la contamination lors de l'incident d'éviscération, les bactéries peuvent être en effet déposées (98) sur la face interne ou la face externe de la carcasse. Ceci peut les amener au contact de la peau (face externe), de tissu conjonctif comme le feuillet viscéral du péritoine (face interne) ou de masses musculaires plus ou moins recouvertes d'un tissu conjonctivo-adipeux. Il donc été intéressant d'évaluer les éventuels effets liés à la nature de cette matrice.

Nos modèles ont été appliqués à ce jour aux viandes de boucherie des espèces porcine et bovine.

### 1.1.1 Choix des souches de *Campylobacter*

#### 1.1.1.1 Choix des espèces bactériennes

Nous avons choisi de restreindre notre étude aux deux espèces du danger *Campylobacter* qui sont :

- mises en cause dans la plupart des cas humains (importance en santé publique)
- mises en évidence fréquemment sur les viandes ou les carcasses

D'après les données bibliographique, notre choix se porte sur :

- L'espèce *Campylobacter jejuni*, responsable de la majorité des cas humains et isolée surtout à partir de viandes de volailles ou de bovins.
- L'espèce *Campylobacter coli* : deuxième espèce rapportée dans les cas humains, isolée sur les viandes de porcs et en moindre proportions sur les viandes bovines et de volailles.

Nous vérifions que les deux espèces choisies sont mises en évidence de façon naturelle sur les matrices carnées utilisées dans le protocole et décrites plus loin (bovin et porc).

### **1.1.1.2 Choix des souches bactériennes**

Deux souches pour chaque espèce sont utilisées pour les expérimentations, une souche de référence et une souche sauvage.

Les deux souches de référence retenues sont :

- Pour *Campylobacter jejuni*, la souche NCTC 11168 isolée chez l'homme dans les fèces par Skirrow en 1977 et conservée par le Laboratoire central Public de Santé Anglais au sein de la Collection Nationale des Types Cellulaires (NCTC). Elle fût la première souche dont le génome a été entièrement séquencé.
- Pour *Campylobacter coli*, la souche CIP 7081 isolée par A. Florent en Belgique en 1970 à partir de fèces de porc et conservée au sein de la collection de l'Institut Pasteur.

Les souches sauvages choisies sont :

- Pour *Campylobacter coli*, la souche V055 isolée en 2003 sur carcasse de porc au niveau de la gorge en abattoir (98)
- Pour *Campylobacter jejuni*, la souche J049, un *Campylobacter jejuni* isolée à partir de fèces de cochons au cours des travaux de Fosse sur la prévalence de *Campylobacter* en élevage porcin (55).

Au total quatre souches ont été utilisées, une souche de collection et une souche sauvage pour chacune des deux espèces *C. coli* et *C. jejuni*, nommées respectivement C1, C2 et J1, J2.

### **1.1.2 Choix des matrices**

Nous souhaitons respecter la prévalence naturelle sur les viandes des campylobacters précédemment choisis, *C. jejuni* se trouvant surtout sur viande de poulets et de bovin et *C. coli* surtout sur viande de porc. Mais ces spécificités ne sont pas exclusives, on peut aussi trouver *C. coli* sur les viandes bovines ou sur les viandes de poulet et *C. jejuni* sur les viandes de porc.

Beaucoup de données concernent les viandes de volailles. Le douchage et le parage, que nous souhaitons étudier avec nos deux modèles, ne sont pas des méthodes utilisées en abattoir de volailles, mais plutôt pour les abattoirs de Mammifères. Le manque de données concernant la viande de porc et de bovin, ainsi que la forte demande quant aux actions correctives pouvant être envisagées dans les abattoirs de ces espèces, oriente notre choix vers ces deux espèces. Nous tenons aussi compte des possibilités d'approvisionnement et du coût (besoins ponctuels de morceaux particuliers en quantité importante). Ces différents éléments, nous ont conduits à retenir trois matrices aux surfaces distinctes :

- Viande bovine non recouverte par une séreuse (surface « naturelle » du muscle, autrement dit non tranchée, avec un perimysium et un épimysium intact)
- Viande bovine recouverte d'une séreuse (le péritoine)
- Couenne de porc : épithélium malpighien.

#### **1.1.2.1 Matrice viande bovine**

La viande bovine a été prélevée à l'ENVN sur des bovins euthanasiés ou morts au maximum dans les 12h précédentes. Les carcasses de bovins, datant de la veille au soir, sont conservées dès leur mort à 4°C, non éviscérées et non saignées. Ces deux différences par rapport à une technique d'abattage classique, ne modifient pas les propriétés biologiques, biochimiques et histologiques du tissu musculaire. En effet, les

tissus d'une carcasse d'agneau non éviscérée et conservée à 20 °C pendant moins de 24 h ne subissent pas un envahissement bactérien majeur (68). Par ailleurs, les travaux scientifiques concernant les conséquences de la saignée sur la qualité du produit final concernent essentiellement le muscle de poisson. Par exemple dans le cas de chair de carpe (*Cyprinus carpio*) (97), la saignée ne modifie pas les caractéristiques d'hydratation et de résistance mécanique des filets, mais ses conséquences sont par contre fort logiquement marquées sur les caractéristiques de couleur. Nous pouvons donc penser que nos échantillons ne sont pas affectés dans leur structure histologique et biochimique par rapport à une viande issue d'un animal ayant été saigné.

Le muscle prélevé est le muscle droit de l'abdomen (*Rectus abdominis*), en raison de sa faible épaisseur et de la présence de péritoine adhérent sur une de ses faces. Le prélèvement est réalisé le plus souvent après éviscération.

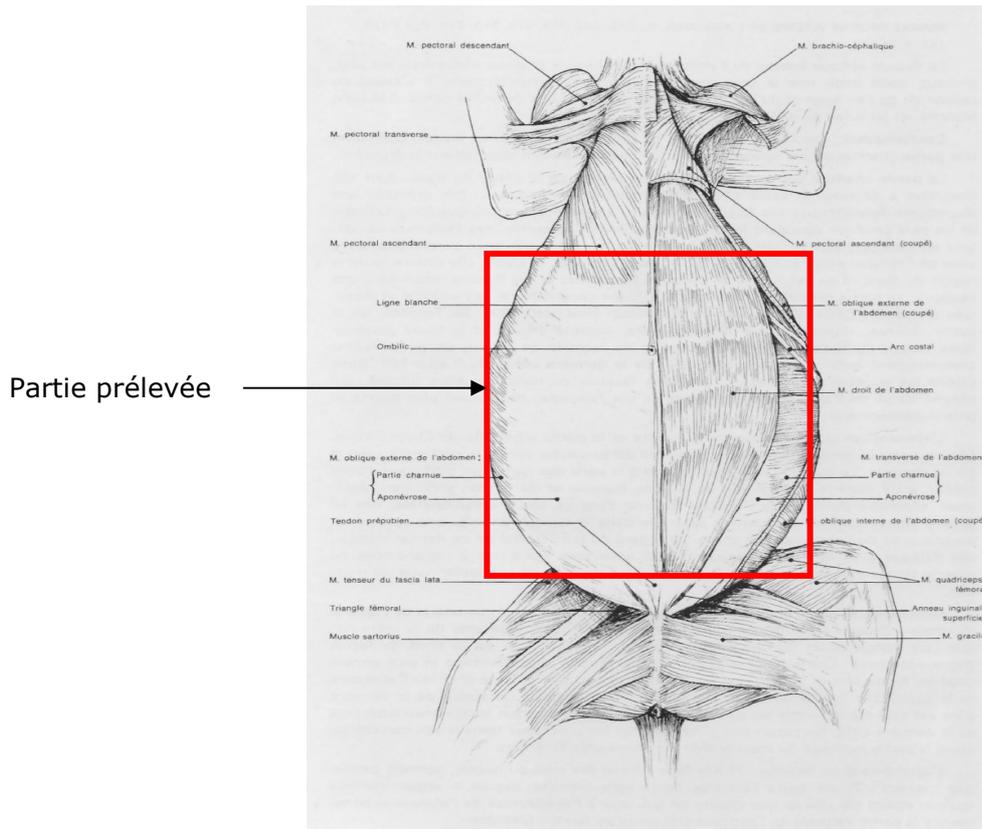


Figure 9 : Muscles de la face ventrale du thorax et de l'abdomen du bœuf, d'après(6).

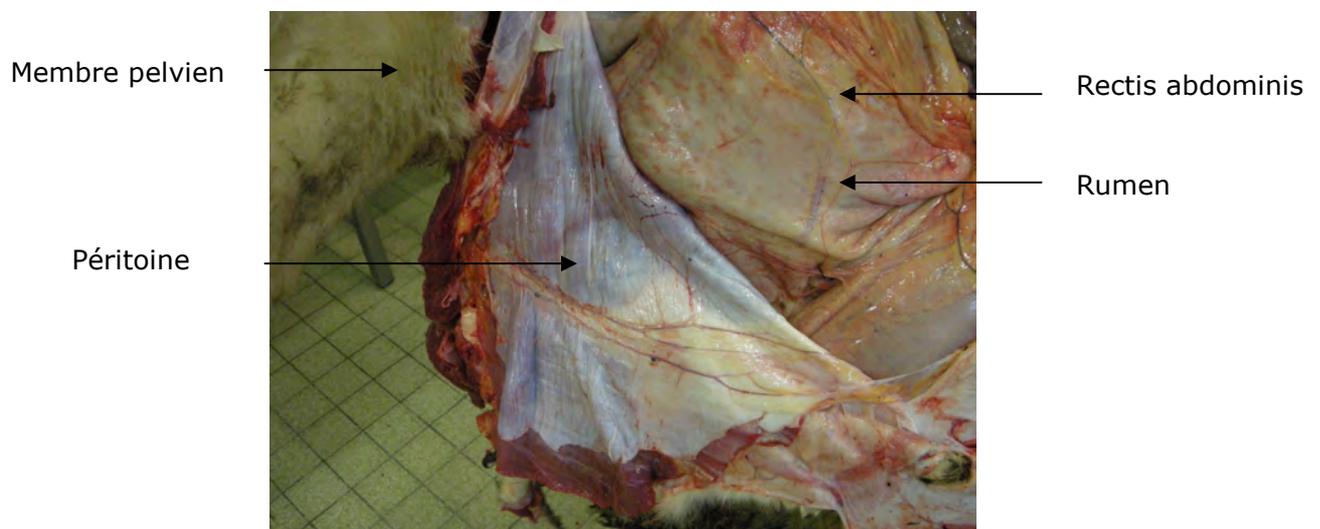


Figure 10 : Muscle droit de l'abdomen d'un bovin avant prélèvement

Ce muscle est anatomiquement intéressant car il présente deux faces distinctes : une face musculaire et une face recouverte par une séreuse, le péritoine. Le péritoine est une membrane mince et transparente qui tapisse la cavité splanchnique et les viscères qui y sont contenus. Histologiquement, il est constitué sur la face interne d'un mésothélium d'aspect endothélial recouvrant une mince strate de tissu conjonctif (*Lamina propria serosa*), qui est doublée d'une couche conjonctive plus épaisse, la sous-séreuse.

A raison d'une autopsie en moyenne par semaine, l'approvisionnement en viande était discontinu. Il a donc été nécessaire de stocker cette viande pour la continuité des expériences.



Figure 11 : Muscle droit de l'abdomen d'un bovin stocké sous vide

La découpe des échantillons « viande bovine » nécessite un stockage préalable d'au moins 48 h à 72 h afin de s'affranchir des effets de la *Rigor mortis* sur la taille et la forme des échantillons. Ce stockage est réalisé sous vide dès la récupération et est couplé à une réfrigération à 4°C, car le froid associé à la mise sous vide permet de ralentir la croissance bactérienne et donc de conserver les viandes pendant un temps relativement long (156).

Selon le jour d'approvisionnement, les viandes sont conservées sous vide entre 5 et 10 jours. Nous tenons compte de l'influence possible de ce délai de conservation sur la flore mésophile totale présente lors de l'ensemencement par *Campylobacter*.

### **1.1.2.2 Matrice Couenne de porc**

L'approvisionnement en couenne de porc se fait dans le commerce local. Pour être dans des conditions comparables, la couenne est aussi conservée au froid (4°C) sous vide pour une durée maximale de 7 jours.

Nous pouvons donc évaluer l'influence de la nature de la surface de contact sur la dispersion ou la pénétration des bactéries.

Pour résumer, nous disposons donc au total de trois surfaces d'étude différentes :

- Viande bovine recouverte d'une séreuse dite « Viande avec Séreuse »
- Viande bovine non recouverte d'une séreuse dite « Viande sans séreuse »
- Couenne de porc (côté « peau ») dite « Couenne »

## **1.2 Fabrication des modèles**

### **1.2.1 Découpe des matrices carnées**

Quelle que soit la matrice, nous travaillons sur des morceaux carrés de 5 cm de côté découpés à l'aide d'un gabarit, d'épaisseur variable (Tableau X) et déposés dans des

boîtes de Pétri (Figure 12). Les échantillons sont préparés sous hotte, à l'aide d'instruments stériles baignés dans l'alcool entre deux opérations (scalpel, pincettes, gabarit).



Figure 12 : Illustration de la découpe des deux matrices étudiées : couenne et muscle droit de l'abdomen.

Tableau X : Epaisseurs approximatives des matrices utilisées

Matrices	Couenne	Viande sans séreuse	Viande avec séreuse
Epaisseur moyenne (mm)	3	8	8

Pour le muscle, les opérations de découpe diffèrent selon la surface que l'on souhaite étudier (présence ou non d'une séreuse). Nous découpons le muscle *Rectus abdominis* de façon à ce que la surface de contact avec les bactéries (face supérieure du morceau de 5 cm par 5 cm) soit une surface non issue d'une découpe. Autrement dit, pour nos échantillons « viande sans séreuse », nous ôtons le péritoine à l'aide d'un scalpel, mettant ainsi à nu la surface naturelle du muscle, c'est-à-dire les faisceaux de fibres musculaires recouverts de pérимыsium ou d'épимыsium. Pour nos échantillons « viande avec séreuse » nous laissons le péritoine en place.

### 1.2.2 Modèle « Pénétration » ou « non inclus »

Ce modèle doit permettre de détecter et de quantifier la pénétration éventuelle des bactéries depuis la surface contaminée vers la profondeur de la matrice. Pour cela, nous devons pouvoir évaluer la présence ou l'absence de bactéries et les quantifier dans des couches de matrices superposées.

Pour les matrices « viande », nous avons utilisé des morceaux d'environ un centimètre d'épaisseur découpés transversalement en deux « tranches » (Figure 13). La manipulation du carré de matrice après ensemencement étant délicate du point de vue

du risque de contaminations accidentelles, les coupes transversales ont été effectuées avant l'ensemencement.

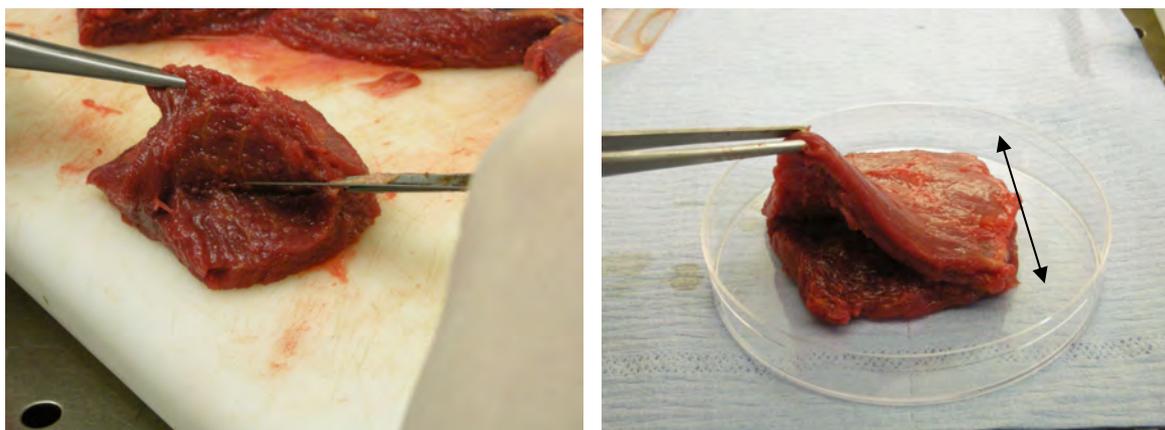


Figure 13 : Exemple de la découpe de la couche supérieure et inférieure constituant le modèle Pénétration sur matrice Viande.

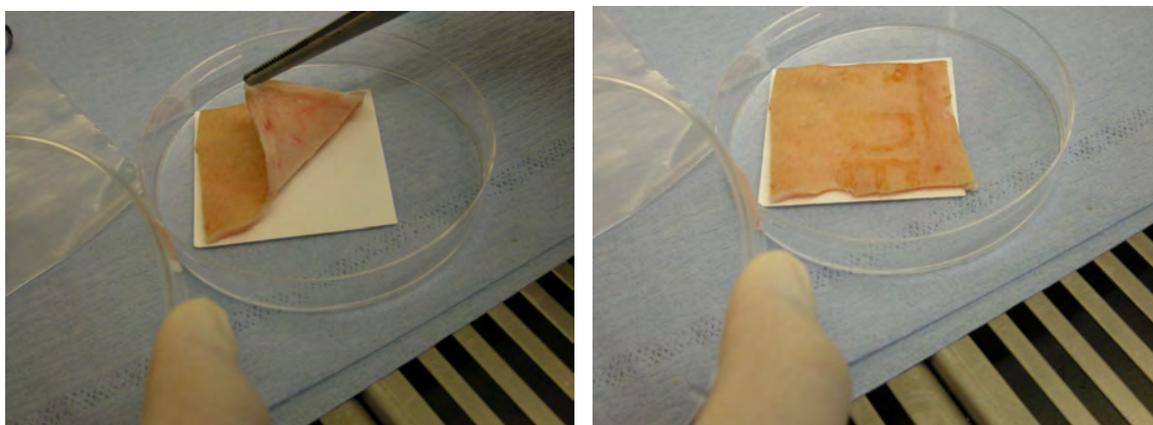


Figure 14 : Illustration de la couche supérieure et inférieure constituant le modèle Pénétration en matrice Couenne.

Pour les matrices « couenne », étant donné la faible épaisseur de ces morceaux, la couche inférieure est constituée par un carré de papier pour chromatographie (porosité définie) Whatman® 3MM de 5 cm par 5 cm (Figure 14).

Pour la matrice « viande avec séreuse », la couche supérieure considérée est la séreuse elle-même et la couche inférieure correspond à la viande sous-jacente.

Pour tous ces modèles à deux couches, un carré de papier Whatman est déposé en surface à la fin du temps de contact inoculum-matrice carnée. Il absorbe l'inoculum restant et permet ainsi de quantifier cette fraction. Il évite également une contamination par écoulement lors de la séparation ds deux couches superposées pour la quantification des bactéries.

Dans ce modèle Pénétration, trois compartiments sont donc susceptibles de contenir des bactéries :

- Papier Whatman absorbant déposé au dessus à la fin du temps de contact dit « papier absorbant »
- Couche supérieure (séreuse ou muscle ou couenne) dit « Haut »
- Couche inférieure (muscle ou papier) dit « Bas »

### 1.2.3 Modèle « Dispersion » ou « inclus »

Le modèle « Dispersion » doit permettre de quantifier la répartition des bactéries à la suite d'un rinçage de la surface de la matrice inoculée. Nous devons donc quantifier les bactéries présentes autour du carré de matrice. Pour cela, nous utilisons les carrés de matrice disposés dans une boîte de Petri et inclus dans une gélose d'Agar à 2% (Figure 15).

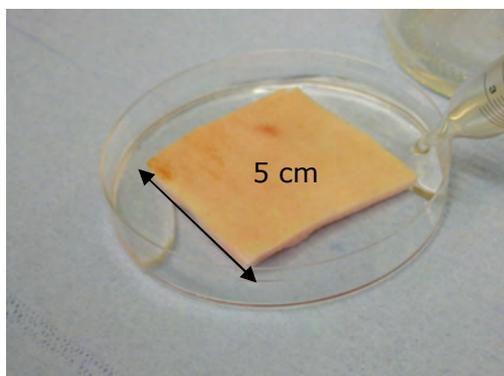


Figure 15 : Inclusion d'un échantillon de couenne dans de l'agar à 2%.

L'Agar à 2% est préalablement stérilisé, puis fondu à 100 °C et thermostaté à 45 °C avant utilisation. Lors de l'inclusion des carrés de matrice qui ont été stockés dans l'étuve froide, l'Agar à 45°C est coulé autour de la viande, qui subit alors un réchauffement non dénaturant mais susceptible d'influencer le développement de la flore mésophile. L'Agar est déposé de telle sorte que la surface de la matrice affleure au niveau de la gélose de façon à ce que les bactéries ne soient pas retenues artificiellement par une irrégularité de surface ou un effet de bords. Le volume d'agar déposé est enregistré pour chaque boîte. Après inclusion, les boîtes fermées restent sous la hotte environ une heure pour permettre la prise en masse lente de l'agar avant d'être entreposées à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

Le rinçage des carrés de matrice dans les boîtes est réalisé avec de l'eau physiologique (NaCl 0,9%) afin d'éviter tout effet osmotique sur les bactéries.

Pour ce modèle Dispersion, trois compartiments sont susceptibles de contenir des bactéries :

- Le carré de matrice dit « Matrice »
- L'eau de rinçage dit « Rinçat »
- La gélose entourant la matrice dit « Agar »

Dans la suite de cet exposé nous appellerons « matrices préparées » les matrices ainsi traitées. Les « matrices préparées » sont conservées à 4°C jusqu'à utilisation, afin de limiter le développement bactérien, ce qui correspond à une durée de 24 h ou 48 h (matrices utilisées le lendemain ou le sur-lendemain de leur préparation).

Nos deux modèles « Pénétration » et « Dispersion » sont constitués de trois compartiments susceptibles de contenir des bactéries (Tableau XI).

Tableau XI : Nomenclature des trois compartiments étudiés pour les deux modèles.

	<b>Modèle Pénétration</b>	<b>Modèle Dispersion</b>
Compartiment 1	Papier	Rinçat
Compartiment 2	Haut	Matrice
Compartiment 3	Bas	Agar

Ces matrices sontensemencées avec un inoculum de *Campylobacter* réalisée à partir d'une culture *in vitro* sur gélose. Après inoculation, nous mesurons la quantité des bactéries, flore mésophile totale et *Campylobacter*, présentes dans chaque compartiment, afin de quantifier les phénomènes de dispersion et de pénétration.

### 1.2.4 Schéma chronologique général des expérimentations

Nous appelons « expérimentation » un ensemble d'opérations unitaires visant à quantifier, pour plusieurs échantillons, les populations bactériennes, *Campylobacter* et flore totale, dans les différents compartiments. Le détail de ces opérations sera développé par la suite mais nous souhaitons, en préambule, identifier de façon générale (Figure 16) ces opérations unitaires et les étapes préalables.

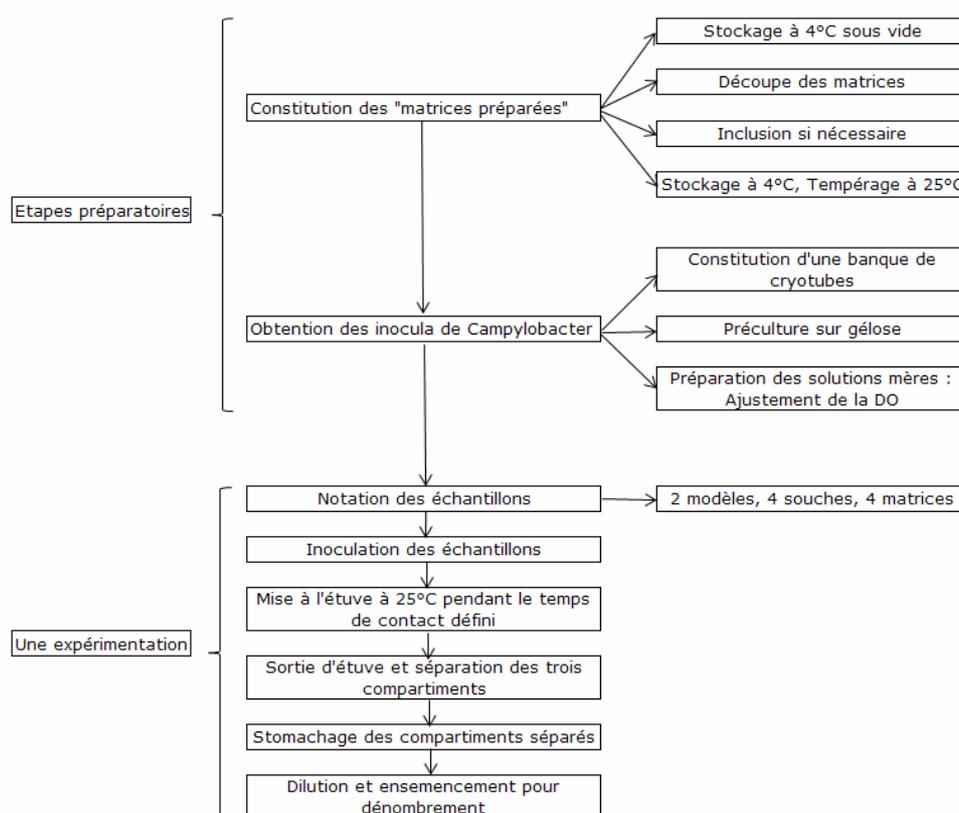


Figure 16 : Schéma chronologique des opérations unitaires mises en œuvre lors de notre étude expérimentale.

Nous présentons les résultats correspondants à 17 expérimentations effectuées lors de notre stage.

## 1.3 Obtention des inocula de *Campylobacter*

### 1.3.1 Culture *in vitro* de *Campylobacter* pour l'obtention des inocula

*Campylobacter* se cultive assez difficilement *in vitro* : son temps de génération est long même en conditions optimales (de l'ordre d'une heure en milieu BHI), ses conditions de croissance sont singulières et le risque de contaminations est élevé (Annexe C).

Pour notre étude, nous devons obtenir une culture pure, en grande quantité que l'on peut disperser dans un milieu neutre liquide (eau physiologique NaCl 0,9%) afin d'en connaître les caractéristiques turbidimétriques. Voici notre cahier des charges pour l'obtention de ces cultures :

- Obtenir une culture pure d'une quantité suffisante de bactéries pour préparer environ 4 mL de dispersions à  $10^7$  UFC/mL.
- Utiliser de préférence un milieu solide pour récupérer facilement les colonies et réaliser des dispersions bactériennes dans de l'eau physiologique (analyses spectrométriques connues et aisées)
- Choisir un milieu de culture peu coûteux et facile à se procurer, en prévision de la quantité importante d'expérimentations envisagées
- Obtenir une croissance la plus rapide possible pour respecter les délais de l'expérimentation et l'exigence de répétabilité (reproductibilité)
- Limiter le risque d'apparition de contaminants.

Malgré une application rigoureuse des conditions de culture spécifiques à *Campylobacter* (milieu sélectif Karmali, incubation en jarres étanches sous une atmosphère microaérophile... voir Annexe C), les contaminations ne sont pas systématiquement évitées. Il s'agit d'un réel problème lors de la culture de *Campylobacter*. Il faut donc vérifier l'aspect macroscopique caractéristique et homogène des cultures : les colonies de campylobacters peuvent présenter des aspects différents (50) :

- Généralement rondes, élevées, convexes, de faibles diamètre (1-2 mm), lisses et brillantes avec un bord régulier
- Mais également étalées, plates, grises, en tâches de bougie, quelquefois granuleuses transparentes avec un bord irrégulier.

Il est nécessaire, également, de vérifier l'aspect microscopique des bactéries. Aussi, à l'issue de chaque culture, nous réalisons une coloration de Gram. Les campylobacters sont des bactéries à coloration de Gram négative, spiralées ou de forme hélicoïdale. Lors des phases tardives de la courbe de croissance, ces bactéries prennent une forme dite « coccoïde » qui les rend moins aisément identifiables. A l'état frais, elles sont mobiles grâce un flagelle et prennent un aspect caractéristique en « vol de moucheron ».

Afin de diminuer les risques d'évolution des souches et de contamination, nous avons constitué une banque de cryotubes (Figure 17) à usage unique pour chacune des souches. A chaque expérimentation, un cryotube pour une souche était donc utilisé pour la constitution des inoculas.

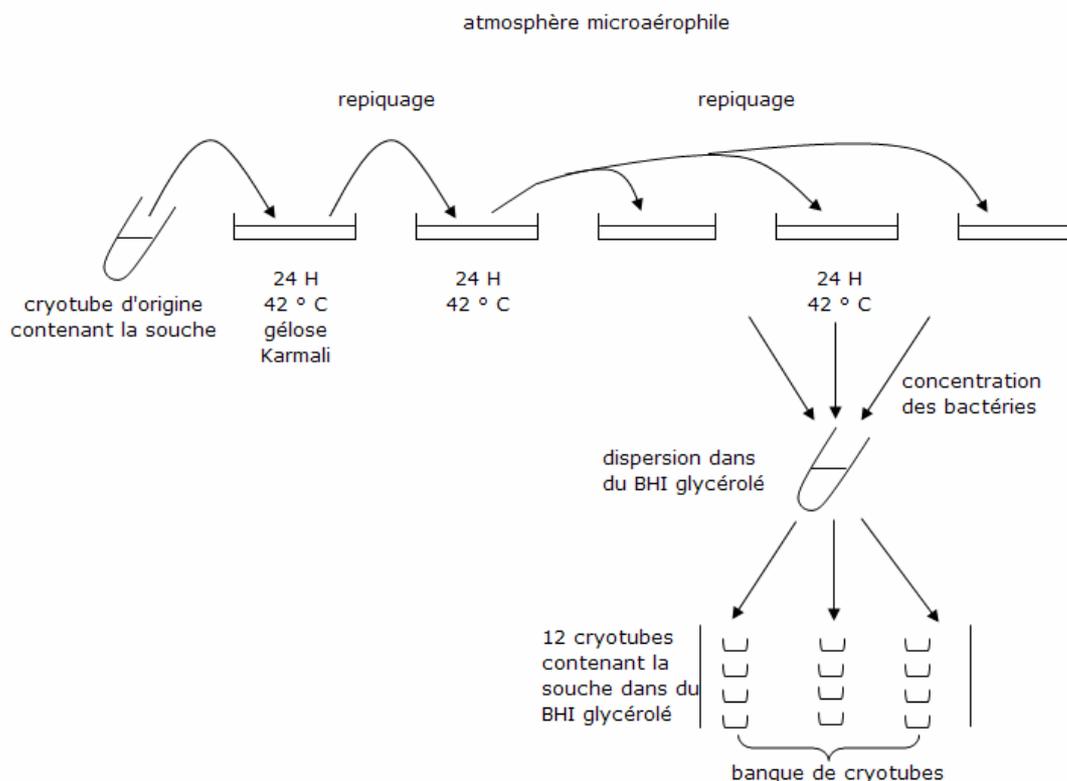


Figure 17 : Etapes pour la constitution d'une banque de cryotubes

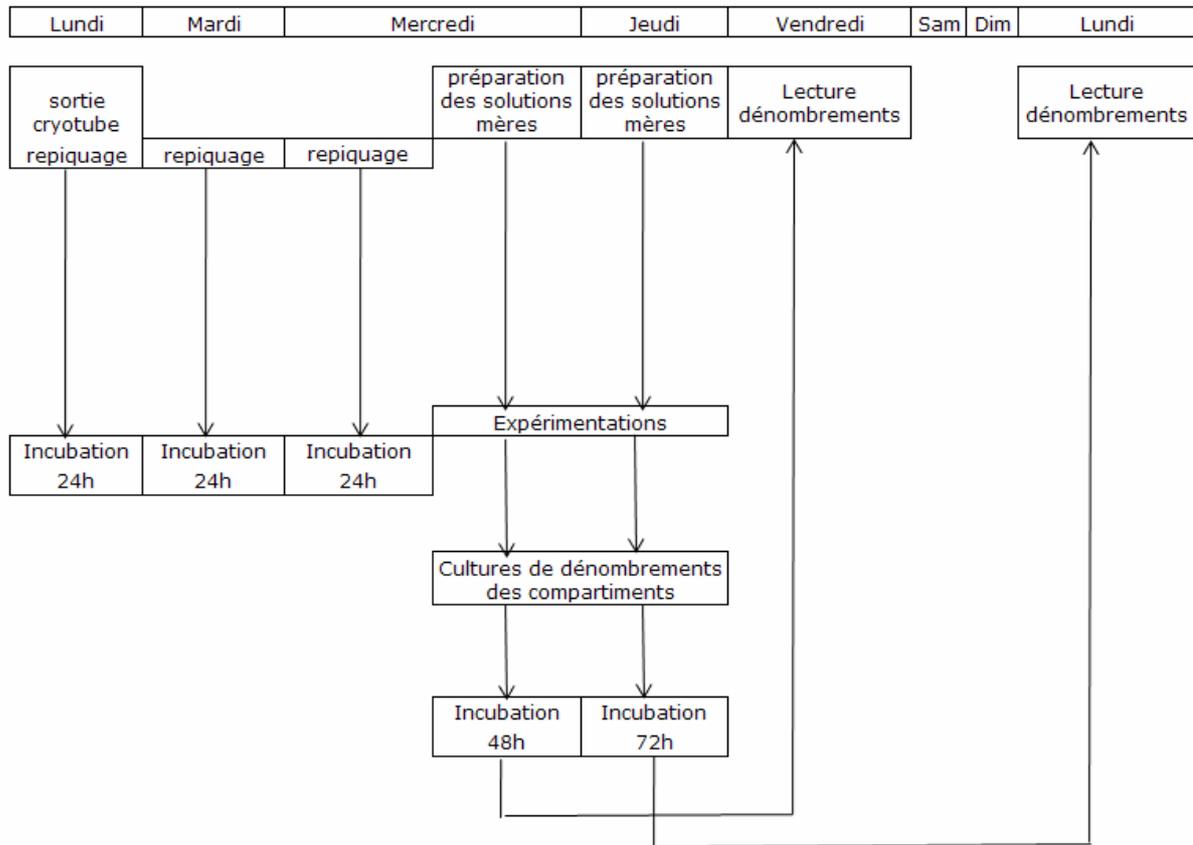
Les souches utilisées sont fournies par le laboratoire et sont issues de la souchothèque de cryotubes conservés à -80 °C de l'UMR 1014. Une partie du contenu du cryotube d'origine est étalé sur une boîte de Pétri contenant une gélose Karmali et incubé dans une jarre étanche remplie d'un mélange gazeux microaéroophile pendant 24 h (une boîte par souche). Un deuxième repiquage, avec toujours une seule boîte par souche, a été réalisé et les souches ont été mises à incubé à nouveau 24 h à 42 °C. Un troisième et dernier repiquage, mis à incubé 24 h à 42 °C, est réalisé sur 3 boîtes par souche afin d'obtenir une quantité suffisante de colonies pour produire une douzaine de cryotubes par souche. Les cryotubes contiennent tous 0,5 mL de dispersion homogène de bactéries dans du BHI glycérolé à 20%. Ils sont conservés à -80 °C.

## 1.3.2 Préparation des inocula

### 1.3.2.1 Préculture

Voici les étapes de préculture mises en œuvre permettant de remettre en culture les souches stockées en cryotubes (Figure 18) :

- Sortie et ensemencement sur Karmali du cryotube le lundi (J0), mise en incubation 24h en jarre
- Repiquage le mardi (J1) matin et incubation 24h
- Repiquage le mercredi matin (J2) et incubation 24h, utilisation des cultures pour les expérimentations de l'après midi
- Utilisation des cultures du jeudi matin (J3) pour les expérimentations de l'après midi



Incubation : à 42°C en atmosphère microaérophile

Figure 18 : Planning hebdomadaire des opérations unitaires constituant deux expérimentations.

### 1.3.2.2 Quantification des inocula à partir de la préculture : Utilisation de la Densité Optique

Pour ensemer nos matrices, nous utilisons des inocula issus de solutions mères. Une fois les précultures sur milieu solide obtenues, nous réalisons des dispersions bactériennes en milieu liquide. Nous choisissons d'utiliser l'eau physiologique car ce milieu non nutritif évite toute croissance bactérienne tout en permettant la survie des bactéries. De plus, il permet d'utiliser la spectrométrie pour calibrer les solutions mères (utilisée en routine au laboratoire).

Le spectromètre optique mesure une Densité Optique (DO). On l'appelle également absorbance (A). Elle mesure la capacité d'un milieu à absorber la lumière qui le traverse. Elle est caractéristique d'une longueur d'onde ( $\lambda$ ) donnée. Dans une certaine gamme de concentration, l'absorbance vérifie la relation de Beer-Lambert, une relation empirique reliant l'absorption de la lumière aux propriétés des milieux qu'elle traverse. Il s'agit d'une relation de proportionnalité entre la concentration d'une entité chimique en solution, l'absorbance de celle-ci et la longueur du trajet parcouru par la lumière dans la solution.

$$DO = A = \log(I_0/I) = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot C$$

avec  $I_0$  l'intensité lumineuse incidente à la longueur d'onde  $\lambda$ ,  $I$  intensité lumineuse transmise,  $\varepsilon_{\lambda}$  est le coefficient d'extinction molaire,  $l$  la longueur du trajet optique,  $C$  la concentration en substance absorbante.

Pour une dispersion bactérienne diluée (comme notre solution mère), la turbidité est assimilée à la DO. Si la loi de Beer-Lambert est vérifiée (proportionnalité DO-concentration), la mesure de la DO permet de remonter à la concentration des composés absorbants. Nous utilisons des dispersions bactériennes dans l'eau physiologique, de DO donnée, préparées le matin à partir de culture et qui sert pour notre série d'expérimentations de l'après-midi. Leur DO est comprise entre 0,85 et 0,89 pour une longueur d'onde de 600 nm. Ceci correspond à une concentration bactérienne comprise entre 6 et 8 log (UFC/mL). En plus de la mesure de DO, un aliquote de chaque solution mère est dilué et ensemencé sur une gélose Karmali afin d'en vérifier la concentration.

### **1.3.3 Ensemencement des échantillons : inoculation**

Chaque carré de matrice est inoculé avec une seule souche de *Campylobacter*, afin de mettre en évidence un éventuel effet de la souche. L'inoculum de 100 µL est prélevé dans la solution mère homogénéisée au préalable par une agitation au Vortex. Ce qui correspond à un niveau de contamination compris entre 5 à 7 log UFC/échantillon. La concentration de la solution mère est toujours vérifiée par dilution, ensemencement et comptage sur gélose Karmali.

Nous réalisons deux types d'inoculation pouvant mimer les deux situations extrêmes de contamination d'origine digestive à l'abattoir :

- « Contamination localisée » par dépôt du volume 100 µL en 10 gouttes réparties sur le carré de matrice
- « Contamination étendue » par dépôt du même volume mais suivi d'un étalement de l'inoculum sur la surface de l'échantillon à l'aide d'une öse

L'inoculation se réalise sous hotte à l'aide d'une micropipette à embout jetable.

#### **1.3.3.1 Temps de contact**

Nous souhaitons évaluer l'influence du temps de contact entre la matrice et l'inoculum bactérien. Nous choisissons deux durées de contact pour nos expérimentations :

- Une durée courte, 10 min, pouvant correspondre à une correction « immédiate » de la contamination si elle était réalisée sur la chaîne d'abattage
- Une durée longue, 120 min, pouvant correspondre à une correction différée en fin de chaîne d'abattage.

#### **1.3.3.2 Température**

Une sonde de température accompagne des échantillons aux différentes étapes ou est placée sous la hotte ou sur la paillasse afin de contrôler la température.

Les « matrices préparées » sont placées à 25 °C deux heures avant la manipulation afin qu'elles aient atteint cette température lors de l'inoculation. Pendant le temps de contact, les « matrices préparées » inoculées dites « échantillons » sont replacés dans l'étuve, sauf pour les échantillons à durée courte. En effet, à l'abattoir la contamination d'origine digestive peut se produire alors que la température corporelle et notamment la température de surface est aux alentours de 25°C (100).

Les solutions mères sont elles aussi conservées à 25°C, afin de se prémunir contre les effets de la variation de température ambiante (réchauffement lié à l'utilisation d'un bec Bunsen et des hottes).

#### **1.3.3.3 Témoins**

Nous réalisons des témoins non inoculés pour chaque modèle. Les témoins du modèle dispersion sont rincés à l'eau physiologique stérile avant d'être séparés en trois compartiments. Les témoins « pénétration » ne subissent pas de traitement particulier avant séparation.

Nous avons ainsi quantifié la flore totale et détecté la présence éventuelle de *Campylobacter* endogènes sur les matrices carnées non stériles.

## 1.4 Mode opératoire, notations et chronologie

### 1.4.1 Notations

La figure 19 précise la codification des échantillons.

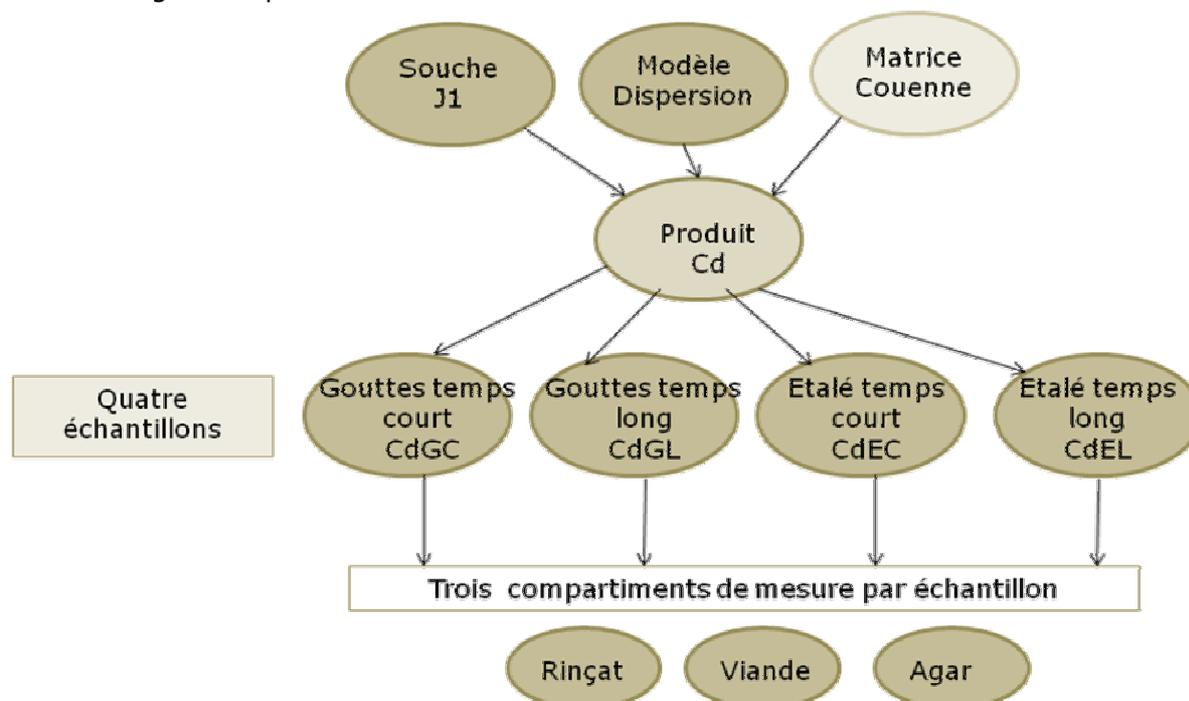


Figure 19 : Schéma d'organisation des échantillons d'un produit, exemple de matrice Couenne en modèle Dispersion

Nous appelons « produit » le triplet (modèle, matrice, souche).

Nous souhaitons évaluer :

- L'effet de la nature de la matrice pour les deux modèles :

Modèle	Couenne	Viande sans séreuse	Viande avec séreuse
Pénétration (non inclus)	Cp	Vp	Sp
Dispersion (inclus)	Cd	Vd	Sd

- l'effet de la souche bactérienne

- les souches *C. jejuni* : NCTC 11168 dite « J1 » et J049 dite « J2 »
- les souches *C. coli* : CIP 7081 dite « C1 » et V055 dite « C2 »

	<i>Campylobacter jejuni</i>		<i>Campylobacter coli</i>	
Nom	NCTC 11168	J049	CIP 7081	V055
Code	J1	J2	C1	C2

Pour différentes conditions de contamination :

- l'effet du mode d'ensemencement ; gouttes dit « G » ou étalement à l'öse dit « E »
- l'effet du temps de contact des bactéries avec la matrice, temps court 10 min dit « C » ou temps long 120 min « L »



Une telle organisation nous a permis de traiter au maximum cinq produits en un bloc de manipulations. Il est impossible d'équilibrer chaque expérimentation. Cette limite technique explique l'hétérogénéité des souches et matrices testées lors de chaque expérimentation. Par ailleurs, nous devons travailler en fonction de l'approvisionnement en matrices, qui peut différer selon les semaines. La diversité des matrices et modèles testés n'a donc pas été la même selon les semaines.

### 1.4.3 Détail du mode opératoire d'une expérimentation

Le mode opératoire que nous avons défini se divise en 7 étapes. Les premières étapes se réalisent sous hotte et à l'aide d'instruments maintenus stériles dans un bain d'alcool à 70°. Les étapes de dilution se réalisent à proximité d'un bec Bunsen.

#### 1.4.3.1 Etape 1 : Ensemencement des « matrices préparées », inoculation des échantillons

Un échantillon est ensemencé avec une seule souche de *Campylobacter*. L'ensemencement est réalisé sous hotte. Le volume de 100 µL est prélevé à l'aide d'une micropipette à embout jetable et déposé en 10 gouttes réparties de façon homogène sur la surface de l'échantillon. Pour les échantillons « E », les gouttes sont étalées à l'aide d'une öse jetable (Figure 20).

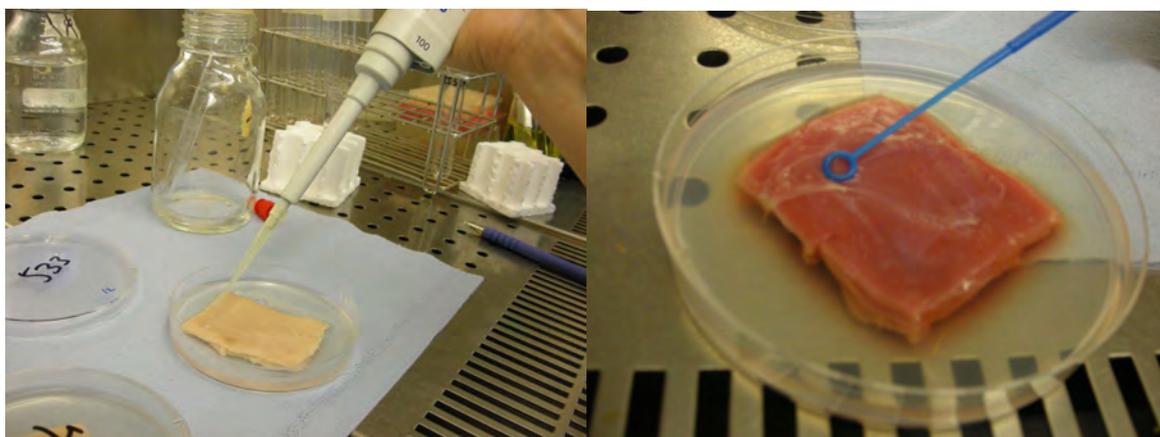


Figure 20 : Etape 1 - Inoculation des échantillons par 100µL d'une solution mère contenant une souche de *Campylobacter* à l'aide d'une micropipette, selon deux modes « gouttes » ou « étalé »

#### 1.4.3.2 Etape 2 : Mise à l'étuve à 25°C de l'échantillon pendant le délai de contact (10 min ou 120 min)

Les échantillons sont maintenus dans une étuve thermorégulée à 25°C pendant le délai de contact (Figure 21).



Figure 21 : Etuve réglée à 25°C contenant les solutions mères et les échantillons en attente d'ensemencement et les échantillons ensemencés.

### 1.4.3.3 Etape 3 : Sortie d'étuve et séparation des trois compartiments à dénombrer

Cette étape diffère selon le modèle.

#### Modèle pénétration

- Dépôt du carré de papier Whatman sur la surface de l'échantillon pour absorber l'inoculum restant pendant 10 s (Figure 22).

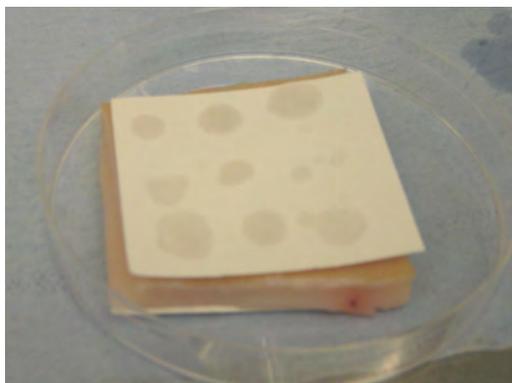


Figure 22 : Dépôt du papier en surface de l'échantillon à la fin du temps de contact.

#### Modèle dispersion

- Rinçage de la surface de l'échantillon par 10 mL d'eau physiologique (solution de NaCl à 0,9%) stérile à température ambiante (Figure 23).

Nous arrosons la surface avec ce volume (à 5 cm de distance) grâce à l'utilisation d'une pipette munie d'un pipetteur automatique afin de mimer l'utilisation d'une douchette. Le rinçat est récupéré après 10 s de contact à l'aide d'une pipette graduée jetable, et transféré dans un tube stérile.

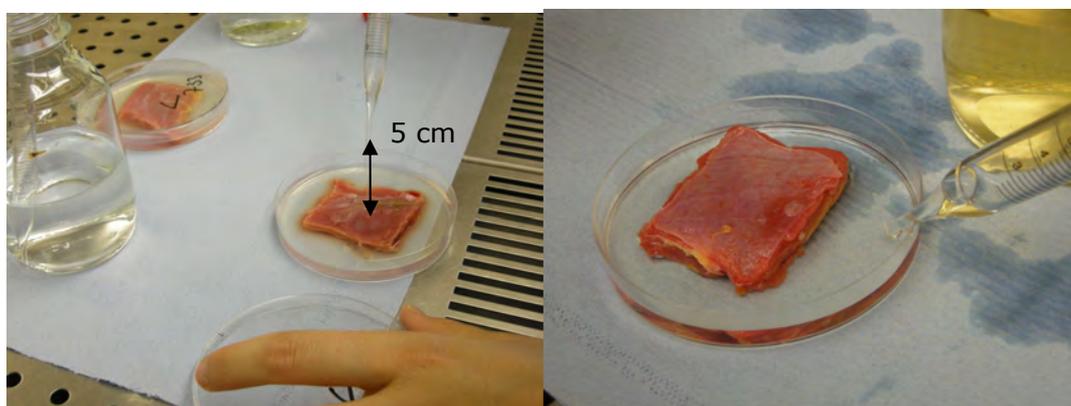


Figure 23 : rinçage de l'échantillon et récupération du rinçat à l'aide d'une pipette jetable

- Etape commune aux deux modèles : Séparation et récupération des trois compartiments puis disposition dans un sac stomacher en vue de la quantification des compartiments (Figure 24).



Figure 24 : séparation du compartiment viande et du compartiment agar et disposition dans un sac stomacher

Pour la matrice Séréuse, la séréuse est séparée du muscle sous-jacent. Pour la matrice Couenne, nous séparons d'une part la couenne, d'autre part le papier sous jacent. Pour la matrice Viande, les deux couches de muscle superposées sont séparées.

#### **1.4.3.4 Etape 4 : Stomachage de chaque compartiment**

Chaque compartiment ainsi séparé et introduit dans un sac stomacher est additionné de 10 mL d'eau physiologique stérile. Les ringats sont utilisés tels quels. Les compartiments « gélose » sont stomachés avec 20 mL d'eau physiologique stérile afin de palier à l'absorption d'eau par l'agar. Le stomachage dure 60 secondes. Fosse montre que le stomachage est une méthode de récupération statistiquement plus efficace que l'écouvillonnage (52).

Le Stomacher® (Figure 25) est un appareil assurant le mélange et l'homogénéisation des échantillons disposés dans un sac stérile et étanche à l'aide de deux pales oscillantes. Nous avons utilisé cet appareil dans le but de transférer les bactéries présentes dans chaque compartiment dans une solution d'eau physiologique. En déterminant la concentration de cette solution, nous avons accès à la quantité de bactéries présentes dans chaque compartiment.



Figure 25 : Stomacher

#### **1.4.3.5 Etape 5 : Dilution et ensemencement au terme du stomachage**

Pour déterminer la quantité de bactéries contenue dans la solution issue du stomachage de chaque compartiment, nous devons réaliser l'ensemencement d'un volume de cette solution sur milieu solide où nous serons capables de dénombrer des colonies ou UFC (Unité Formant Colonie) après incubation. Chaque colonie est issue d'une bactérie contenue dans la solution ensemencée sur le milieu et l'on peut ainsi facilement par calcul obtenir la concentration de la solution ensemencée.

Afin d'en dénombrer le contenu bactérien, la solution issue du stomachage de chaque compartiment et les ringats sont dilués. Ils étaient trop concentrés pour être

ensemencés directement sur le milieu de dénombrement. Les dilutions choisies sont spécifiques du compartiment et du produit. En effet, lors des pré-manipulations, nous avons établi une table de dilution pour chaque couple (produit, compartiment). Si la solution à dénombrer est peu concentrée (couches inférieures surtout), 1mL de solution est déposé au râteau sur le milieu.

Chaque diluât est utilisé pour ensemencer deux milieux correspondant aux deux flores bactériennes suivies : une gélose Karmali et une gélose PCA (Plate Count Agar). La gélose Karmali est un milieu spécifique pour *Campylobacter* dont nous avons déjà parlé. Le milieu PCA est un milieu solide ordinaire non spécifique adapté au dénombrement de la flore mésophile totale (composition en annexe C). Pour chaque compartiment, on évalue ainsi la présence et la quantité de flore mésophile totale et de *Campylobacter*.

L'ensemencement des milieux est réalisé à l'aide d'un ensemenceur spiral Eddyjet qui distribue 0,1 mL de solution par boîte de manière concentrique et centrifuge. Le volume distribué par unité de surface par l'automate diminue progressivement puisque la vitesse linéaire de la seringue augmente. Par conséquent, plus l'on se rapproche des bords de la boîte de Petri, plus les colonies seront dispersées et plus le comptage sera aisé (Figure 27).

#### 1.4.3.6 Etape 6 : Incubation

Après séchage sous une hotte, les boîtes sont incubées :

- à 42 °C pendant 48 h ou 72 h sous atmosphère microaéroophile pour les géloses Karmali
- à 30 °C pendant 20 h pour les géloses PCA.

#### 1.4.3.7 Etape 7 : Détermination du statut du compartiment et de son niveau de contamination : dénombrement des colonies

Un compartiment est déclaré positif dès lors que sur une des boîtes ensemencées, une colonie confirmée de *Campylobacter* ou de flore mésophile totale a été observée. Un compartiment est déclaré négatif dès lors qu'aucune colonie confirmée n'est observée. Son niveau de contamination est alors inférieur au seuil de détection. Pour les compartiments positifs, le niveau de contamination est quantifié par le dénombrement des colonies, et exprimé en UFC/mL.

Chaque colonie est issue d'une bactérie contenue dans le volume ensemencé. Nous calculons ainsi la quantité de bactéries contenues dans le sac stomacher, donc dans le compartiment correspondant.



Figure 26 : Une boîte de gélose Karmali ensemencé à l'automate spirale après incubation

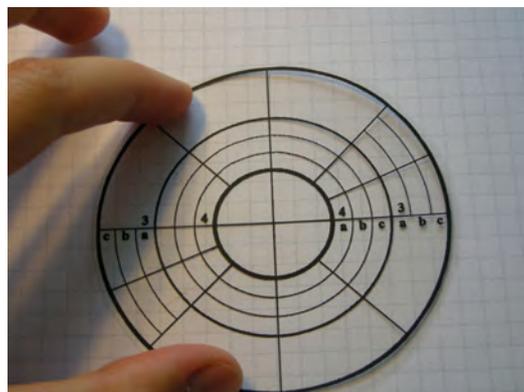


Figure 27 : Disque de dénombrement utilisé

Les comptages sont réalisés à l'aide d'un appareil qui incrémente un compteur lorsque l'on pointe les colonies (Figure 26) avec un feutre sur le couvercle de la boîte. Un

disque (Figure 27) de dénombrement est utilisé lorsqu'il y a plus de 150 colonies sur la boîte car alors le risque d'erreur de comptage est important.

Ce disque est placé au dessus de la boîte de Petri. Au moins 30 colonies doivent être comptées dans des secteurs opposés pour obtenir directement par calcul la concentration de la solution déposée sur la boîte. Ce disque est conçu pour permettre de dénombrer jusqu'à 10 000 colonies sur la boîte. La même technique est utilisée pour le dénombrement des inocula.

### 1.5 Traitement des données obtenues

Les données obtenues sont : le compartiment est négatif ou positif, avec un niveau de contamination en nombre d'UFC/mL. Ces données sont ensuite transformées en logarithme d'UFC par compartiment en utilisant le volume d'eau physiologique et/ou d'agar contenu dans le sac stomacher. La transformation logarithmique est habituelle pour les résultats bactériologiques qui présentent classiquement une distribution log normale.

$$\text{Quantité de bactéries du compartiment(en log/mL)} = \log(\text{Concentration}_{\text{diluat}} * 10^{-\text{dilution}})$$

Le seuil de détection de cette méthode de dénombrement dépend de la dilution utilisée (Tableau XIII). Quand aucune colonie n'est dénombrée sur la boîte, la quantité de bactéries présente est en deçà du seuil de détection.

Nous avons :

$$\text{Seuil de détection (en log/mL)} = \log (10 * 10^{-\text{dilution}})$$

Tableau XIII : Seuil de détection en log UFC/mL selon le compartiment et le modèle

Modèle	Dispersion		Témoins Dispersion	
Matrice	Cd, Vd, Sd		Cd, Vd, Sd	
Milieu	Karmali	PCA	Karmali	PCA
Rinçat	3	3	0	3
Viande	3	3	0	3
Agar	2	2	0	2

Tableau XIII : suite

Modèle	Pénétration		Témoins Pénétration	
Matrice	Cp, Vp, Sp		Cp, Vp, Sp	
Milieu	Karmali	PCA	Karmali	PCA
Papier	3	3	Non considéré	Non considéré
Haut	3	3	0	3
Bas	0	Non considéré	Non considéré	Non considéré

Pour les données quantitatives, nous avons utilisé la représentation en box-plots : ces représentations univariées d'échantillons de données quantitatives sont parfois appelées « diagrammes boîtes à moustaches ». C'est une représentation simple et assez complète puisque dans la version proposée par XLSTAT sont affichés le minimum, le 1er

quartile, la médiane, la moyenne, le 3<sup>ème</sup> quartile, ainsi que les deux limites (les extrémités des « moustaches ») au-delà desquelles on peut considérer que les valeurs sont anormales.

Les limites sont ainsi calculées (Q est le quartile):

- Limite inférieure :  $L_{inf} = Q1 - 1.5 (Q3 - Q1)$
- Limite supérieure :  $L_{sup} = Q3 + 1.5 (Q3 - Q1)$

Pour le traitement des données, plusieurs traitements statistiques ont été utilisés grâce au logiciel XLStat (Addinsoft<sup>TM</sup>, Paris) intégré au tableur Excel. Les statistiques descriptives sont réalisées directement avec le tableur. Nous réalisons également des tests t de Student de comparaison de moyenne des quantités de bactéries récupérées.

Nous avons étudié l'influence de différents facteurs sur la répartition des bactéries des deux flores dans les compartiments par une analyse de variance (ANOVA) et des tests de Fisher (comparaison deux à deux) : temps de contact, mode d'étalement, souche bactérienne, nature de la matrice. Enfin, une Varcomp est réalisé grâce au logiciel SAS (SAS Institute, Cary, N.C.). Il s'agit d'une décomposition de la variance selon les différentes sources de variation.

## 2. Résultats

La mise au point de ces modèles a naturellement nécessité des pré-manipulations importantes. Nous devons déterminer le mode opératoire : la préparation des échantillons (conservation des viandes, délai d'établissement de la *Rigor mortis*, découpe-inclusion...), l'organisation du passage des échantillons en fonction des durées de manipulation et du délai de contact avec l'inoculum, les dilutions à adopter pour le dénombrement de chaque compartiment pour les deux flores suivies. Les résultats de ces pré-manipulations ne seront pas présentés ici.

### 2.1 Nombre d'échantillons réalisés

Au total, 339 échantillons ont été traités, ce qui correspond à 986 résultats de dénombrement de compartiment.

#### 2.1.1 Répartition par modèle

Une quarantaine de produits carnés ont été réalisés pour le modèle Pénétration, une soixantaine pour le modèle Dispersion (Tableau XIV). Lors de chaque bloc d'expérimentation, nous ne pouvions pas utiliser toutes les souches avec toutes les matrices possibles, nous tâchions alors d'équilibrer le nombre d'échantillon selon les matrices et les souches. Nous avons par ailleurs choisi de privilégier, en nombre, le modèle dispersion car il fournit une plus grande quantité d'informations. Nous avons réparti équitablement le nombre de produits entre les quatre souches de *Campylobacter* choisies.

Tableaux XIV : Nombre d'échantillons réalisés en fonction du modèle et de la matrice.

Nombre d'échantillons	Cd	Vd	Sd
Souche C1	16	14	16
Souche C2	15	16	15
Souche J1	15	16	16
Souche J2	16	16	16
Total	62	62	63
Incidents	2	2	1

Nombre d'échantillons	Cp	Vp	Sp
Souche C1	11	12	7
Souche C2	12	11	8
Souche J1	9	10	7
Souche J2	10	11	7
Total	42	44	29
Incidents	6	4	3

Les échantillons appelés « Incidents » ont fait l'objet d'une erreur de manipulation enregistrée durant l'expérimentation (écoulement d'inoculum sur le bord du carré de matrice par exemple). Nous avons donc décidé d'exclure ces échantillons de nos calculs.

Les échantillons ont été répartis sur 8 semaines de manipulations, soit 17 journées. Rappelons que chaque produit, à matrice et souche fixée, est constitué par quatre échantillons (Tableau XV).

Nous avons réalisé deux ou trois témoins par séance de manipulations. Les témoins du modèle Dispersion, au nombre de 22, ont été rincés comme les échantillons. Les témoins du modèle Pénétration, au nombre de 14, n'ont subi aucun traitement avant la séparation des compartiments pour les dénombrements. L'objectif de ces témoins était d'obtenir des données sentinelles sur les *Campylobacter* potentiellement présents avant inoculation et sur la flore totale présente sur les matrices utilisées. Les témoins ont donc

fait l'objet d'un dénombrement, à l'aide des deux milieux précédemment cités, de la flore totale et des campylobacters, pour lequel le seuil de détection est augmenté (voir tableau XIII).

Tableau XV : Nombre d'échantillons selon la matrice et le modèle par mode d'inoculation et temps de contact

Echantillons	G C	G L	E C	E L	Témoins
Cd	16	16	15	15	7
Vd	16	16	15	15	7
Sd	16	16	16	15	8
Cp	11	12	11	8	7
Vp	12	12	12	8	4
Sp	7	5	8	9	3

### 2.1.2 Contrôle de la température

Les variations de température subies par les échantillons sont importantes lors de la réalisation des opérations préparatoires à l'expérimentation déjà présentées figure 16 (inclusion à température ambiante, conservation à 4°C, tempéragé à 25°C). Nous avons contrôlé les variations de température que pouvait subir un échantillon au cours d'une expérimentation grâce à une sonde. Un exemple de suivi de température est présenté en Annexe D. Compte tenu des températures élevées enregistrées aux différents postes de travail, les échantillons sont maintenus à 25°C pendant les expérimentations au sein d'une étuve thermorégulée (sonde ajustée et vérifiée) afin de ne pas leur faire subir de trop fortes variations de températures.

### 2.1.3 Solutions mères

Bien que la densité optique des dispersions utilisées soit bien contrôlée, les résultats des dénombrements réalisés montrent des différences importantes entre les préparations. Les valeurs moyennes pour les quantités inoculées varient entre 5,8 et 6,7 log (UFC/échantillon). La dispersion des résultats est représentée Figure 28 par un box-plot.

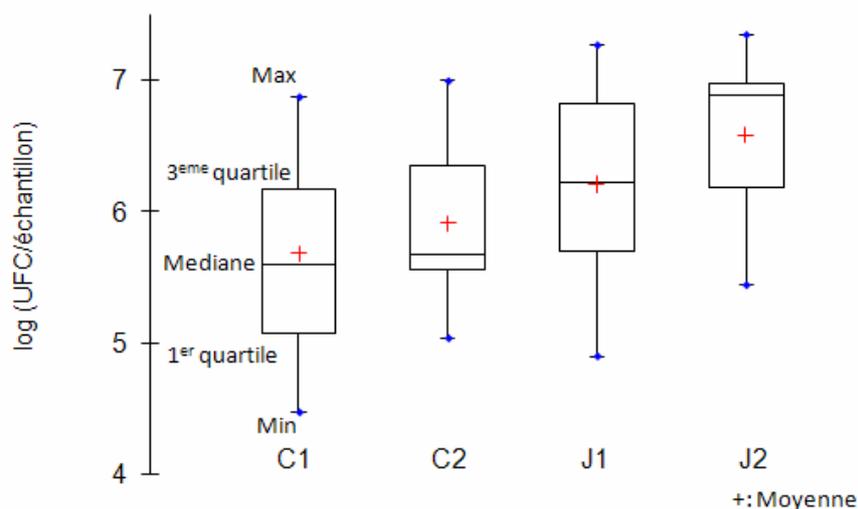


Figure 28 : Box-plots (minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum) représentant la dispersion des résultats de dénombrement pour les inocula de *Campylobacter* utilisés en fonction de la souche.

Les résultats pour les inocula obtenus à partir de la souche J2 sont significativement ( $p > 0,05$ ) supérieurs à ceux obtenus à partir des souches C1 et C2. Les variations importantes observées nous conduisent à privilégier les valeurs relatives.

## 2.2. Résultats *Campylobacter*

Nous présentons ici les résultats des dénombrements sur les géloses Karmali par type de matrice et par compartiment. L'identification macroscopique des colonies a été confirmée de façon régulière par une identification microscopique. Le nombre d'échantillons inférieur au seuil de détection correspond aux compartiments pour lesquels aucune colonie n'était présente sur la boîte de gélose Karmali. Nous envisagerons tout d'abord les résultats obtenus pour les échantillons témoins.

### 2.2.1 Echantillons témoins.

Sur les 36 témoins réalisés, seuls deux se sont avérés positifs en *Campylobacter*. Il s'agissait de matrices viande bovine prélevées deux semaines successives. Après isolement de 4 colonies sur le premier témoin et de 6 colonies sur le second, nous avons effectué une PCR (Polymerase Chain Reaction) (voir principe en annexe C) spécifique de *Campylobacter coli* et de *Campylobacter jejuni*. Les isolats sur les témoins ont été identifiés pour les deux témoins comme appartenant aux deux espèces, *Campylobacter coli* et *Campylobacter jejuni* (Figure 29). Cette association d'espèces sur viande bovine n'est pas rare (4, 113, 129).

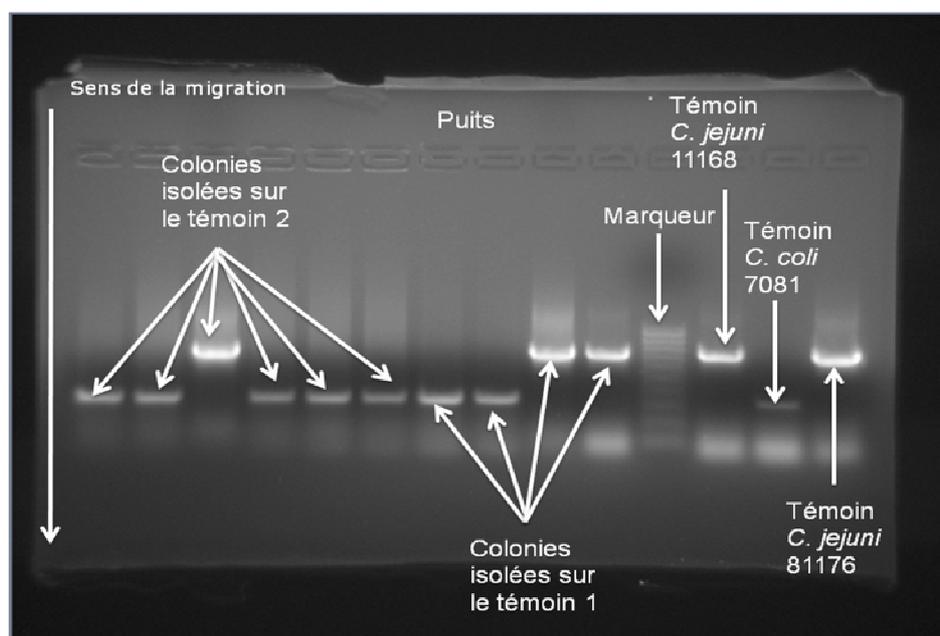


Figure 29 : résultats de l'électrophorèse en gel des produits de PCR réalisées sur les souches témoins.

Le niveau de contamination de ces deux témoins s'élevait à 40 et 60 colonies respectivement par échantillon. Cette quantité est négligeable devant la quantité inoculée pour influencer sur nos résultats.

La caractérisation plus fine par pulsotypage (voir technique en annexe C) de ces isolats en comparaison avec les souches inoculées a montré que (Figure 30) :

- pour les trois isolats (T1-3, T2-3, T2-4) correspondant à l'espèce *C. jejuni* deux clones (T2-3 et T2-4) et une souche T1-3 avec un profil identique à la souche *C. jejuni* inoculée dite « J2 »
- pour les sept isolats identifiés comme appartenant à l'espèce *C. coli*, un clone (T2-1 et T2-2) et un clone (T1-1, T1-4 et T1-5) avec le même profil ; un clone (T1-2 et T1-5) avec un profil. Ces deux profils sont différents des profils des *Campylobacter coli* inoculés.

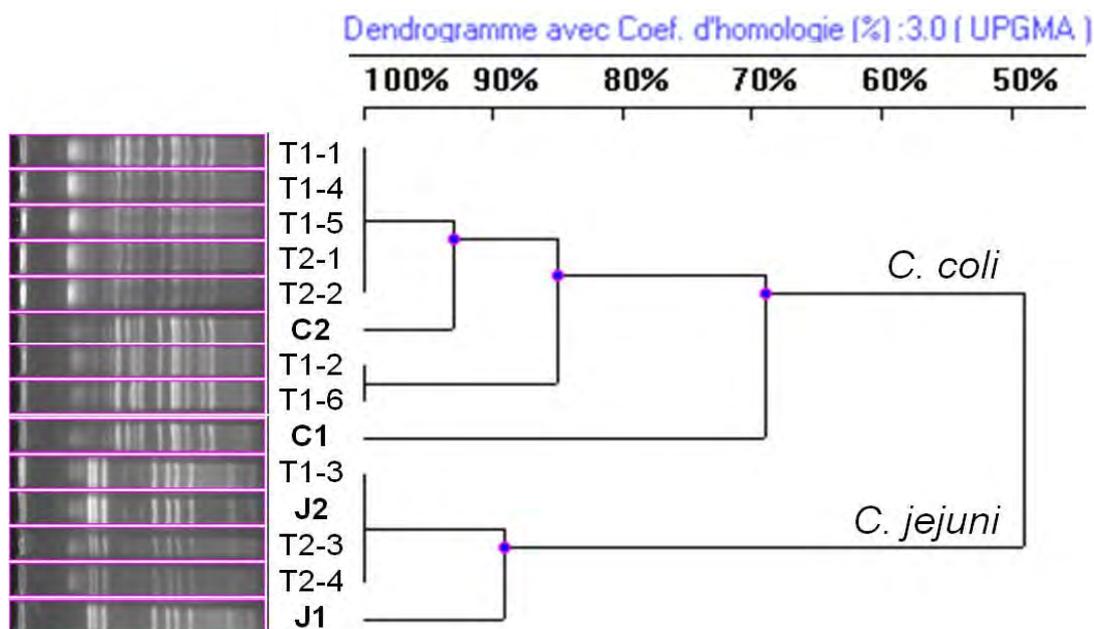


Figure 30 : Dendrogramme réalisé à partir des résultats de pulsotypage pour les souches isolées sur les témoins et les souches utilisées pour les inoculations.

### 2.2.2 Quantité totale de bactéries récupérées

La quantité totale de bactéries récupérées correspond à la somme des quantités dénombrées dans les trois compartiments. La dispersion des résultats est représentée Figure 31 par un box-plot et les résultats bruts sont décrits en annexe D. En modèle Pénétration, la moyenne de la quantité totale de campylobacters récupérés est de 5,90 log (UFC/échantillon) pour la Couenne (minimum : 4,00, maximum : 7,36 écart-type : 1,04), de 5,94 pour la Viande (minimum : 4,00 ; maximum : 6,97 ; écart-type : 0,63) et de 5,62 pour la Séreuse (minimum : 4,48, maximum : 6,73, écart-type : 0,44). Pour le modèle Dispersion, la moyenne quantité totale de campylobacters récupérés est de 5,86 pour la Couenne (minimum : 4,78 ; maximum : 7,57 écart-type : 0,83), de 6,04 pour la Viande (minimum : 4,37 ; maximum : 7,56 ; écart-type : 0,89) et de 6,08 log (UFC/échantillon) pour la Séreuse (minimum : 4,85, maximum : 7,30, écart-type : 0,78).

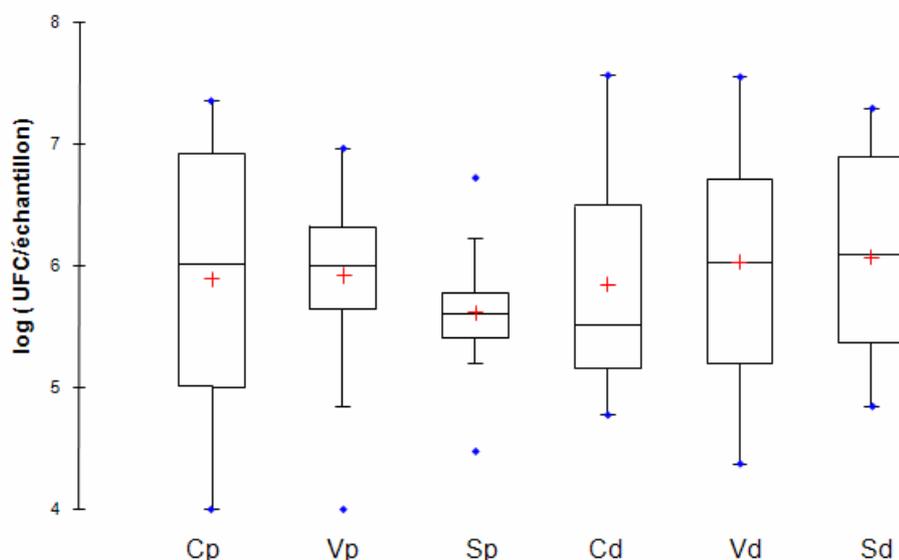


Figure 31 : Box-plot (minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum) représentant la quantité totale de *Campylobacter* récupérés selon la nature de la matrice et du modèle.

Il n'apparaît pas, pour chaque modèle, de différence significative (test T de comparaison de moyenne,  $p > 0,05$ ) entre les résultats obtenus pour la quantité totale de bactéries récupérées selon la nature de la matrice, le temps de contact, et le mode d'étalement. Nous devons remarquer que les valeurs sont comparables quelque soit le modèle considéré. Ceci confirme la validité de notre méthode de récupération.

### 2.2.3 Modèle Pénétration

Les valeurs numériques brutes des dénombrements dans chaque compartiment et la caractérisation de leur distribution sont présentées en annexe D.

- **Quantité de bactéries dénombrées par compartiment**

Pour les compartiments supérieurs dits « Papier », correspondant au papier absorbant déposé en surface (Figure 32) :

- Pour la Couenne, la quantité moyenne de *Campylobacter* détectés est de 5,67 log UFC (minimum : 4,00 ; maximum : 7,14 ; écart-type : 1,00)
- Pour la Viande, de 5,74 (minimum : 4,60 ; maximum : 6,76 ; écart-type : 0,59)
- Pour la Séréuse, de 5,49 (minimum : 4,30 ; maximum : 6,72 ; écart-type : 0,48).

Pour les compartiments inférieurs dits « Haut » (Figure 32) :

- Pour la Couenne, la quantité moyenne de *Campylobacter* détectés est de 5,52 log UFC (minimum : 4,00 ; maximum : 7,20 ; écart-type : 1,00)
- Pour la Viande, de 5,40 (minimum : 4,00 ; maximum : 6,6' ; écart-type : 0,71)
- Pour la Séréuse, de 4,73 (minimum : 4,00 ; maximum : 5,88 ; écart-type : 0,61).

La quantité de *Campylobacter* est plus importante dans le compartiment Papier que dans le compartiment Haut, cette différence est significative pour la Viande et la Séréuse ( $p = 0,006$  et  $p > 0,0001$  respectivement).

Pour les compartiments « Bas » (Figure 32), quelle que soit la nature de la matrice, nous constatons que les résultats de la couche basse sont inférieurs au seuil de détection. Le seuil de détection pour cette couche est de 10 UFC, ce qui est inférieur à la dose infectante de *Campylobacter* (environ 100 UFC). Il n'y a donc pas de contamination détectable en profondeur sur quelques millimètres pendant les délais de contact choisis.

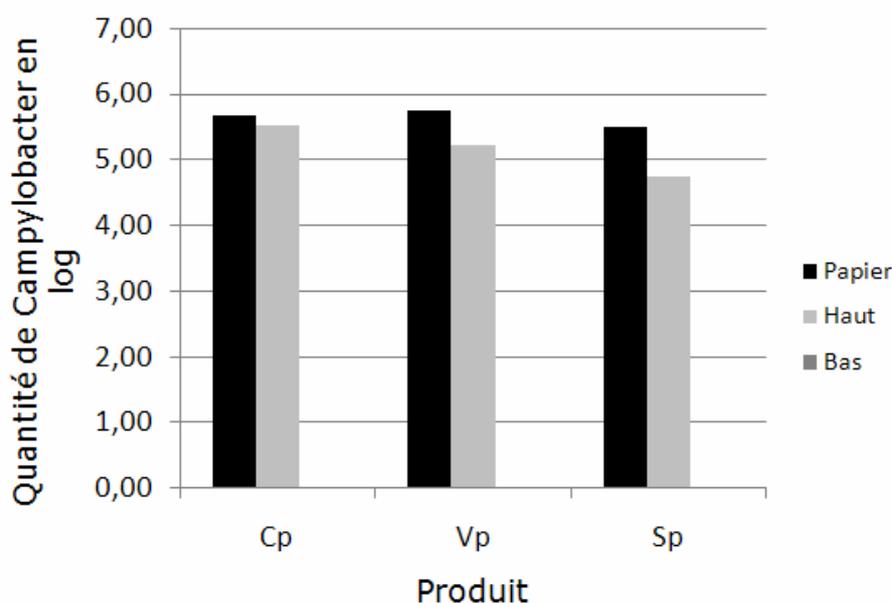


Figure 32 : Histogramme des moyennes de la quantité de *Campylobacter* récupérée selon le compartiment et la matrice en modèle Pénétration.

## 2.2.4 Modèle Dispersion

Les résultats bruts par matrice et par compartiment sont présentés en annexe D.

### • Quantité de bactéries par compartiment

Pour les compartiments dits « Rinçat », correspondant à la quantité de bactéries emmenées par le rinçat (Figure 33) :

- Pour la Couenne, la quantité moyenne de Campylobacters détectés est de 5,60 UFC (minimum : 4,00 ; maximum : 7,22 ; écart-type : 0,84)
- Pour la Viande, de 5,72 (minimum : 4,00 ; maximum : 7,24 ; écart-type : 0,92)
- Pour la Séreuse, de 5,85 (minimum : 4,00 ; maximum : 7,24 ; écart-type : 0,85).

Pour les compartiments dits « Matrice » (Figure 33):

- Pour la Couenne, la quantité moyenne de Campylobacters détectés est de 5,05 UFC (minimum : 4,00 ; maximum : 7,55 ; écart-type : 0,91)
- Pour la Viande, de 5,51 (minimum : 4,00 ; maximum : 7,03 ; écart-type : 0,92)
- Pour la Séreuse, de 5,13 (minimum : 4,00 ; maximum : 6,85 ; écart-type : 0,84).

Pour les compartiments dits « Agar » (Figure 33):

- Pour la Couenne, la quantité moyenne de Campylobacters détectés est de 4,87 log UFC (minimum : 3,54 ; maximum : 6,55 ; écart-type : 0,91)
- Pour la Viande, de 4,99 (minimum : 3,48 ; maximum : 7,02 ; écart-type : 1,03)
- Pour la Séreuse, de 5,01 (minimum : 3,86 ; maximum : 6,49 ; écart-type : 0,83).

La quantité relativement importante de campylobacters retrouvée dans le rinçat montre un effet de lessivage des bactéries (Figure 33).

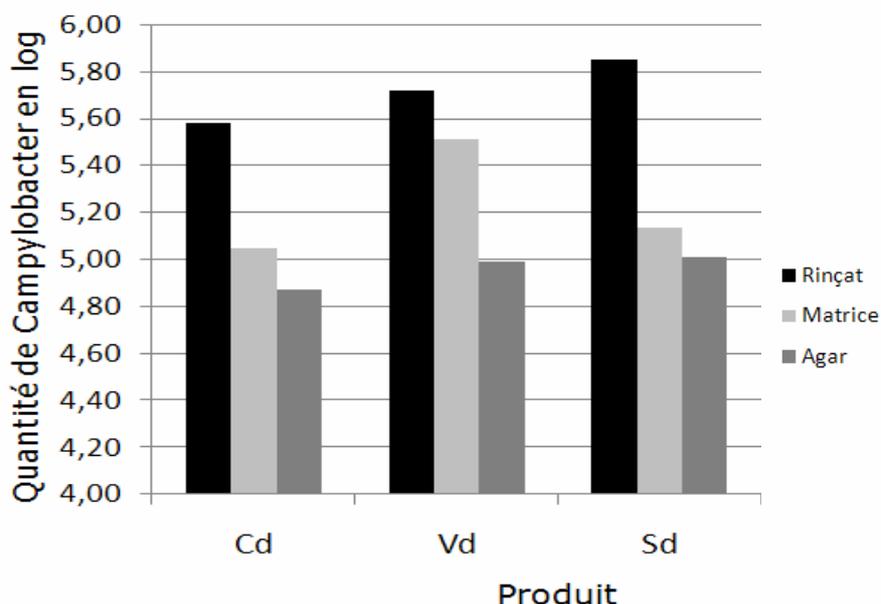


Figure 33 : Histogramme des moyennes de la quantité de Campylobacter récupérée selon le compartiment et la matrice en modèle Dispersion.

Nous avons réalisé un test T pour évaluer la significativité de la différence entre les moyennes obtenues dans chaque compartiment.

A matrice fixée, nous observons que :

- Pour la Couenne : une différence significative entre la quantité moyenne de campylobacters du Rinçat et celles deux autres compartiments (Agar  $p < 0,0001$  et Viande  $p = 0,003$ ). Les Campylobacters sont donc préférentiellement détectés dans le Rinçat pour cette matrice.

- Pour la matrice Viande : une différence significative entre la quantité moyenne déposée sur l'Agar et celles des deux autres compartiments (Viande  $p=0,004$  et Ringat  $p<0,001$ ). Les *Campylobacters* sont donc préférentiellement détectés dans la Viande et dans le Ringat de manière équivalente.
- Pour la matrice Séreuse, une différence significative entre la quantité moyenne de bactéries présentes dans le Ringat et celles des deux autres compartiments (Agar et Viande :  $p<0,0001$ ). Les *Campylobacters* sont détectés préférentiellement dans le Ringat.

De façon générale, les *campylobacters* sont détectés en plus grande quantité dans le Ringat. La répartition des bactéries dans le compartiment Matrice dépend de la nature de la matrice et la proportion de *campylobacters* dans l'agar est quantitativement inférieure aux deux autres compartiments.

### 2.2.5 Rendements de récupération

Pour calculer des rendements de récupération, il faut calculer la somme des quantités de *campylobacters* récupérés dans les trois compartiments d'une part et la quantité inoculée d'autre part. Le rendement de récupération est égal au rapport de ces deux quantités.

L'imprécision des mesures microbiologiques et l'amplification de l'erreur lors de l'utilisation de grandeurs correspondant à des rapports (addition des incertitudes relatives) sont à l'origine d'une forte dispersion des résultats de rendement. Nous observons notamment des rendements ponctuellement supérieurs à un. Nous ne détaillerons pas la dispersion des résultats. Dans la mesure où la distribution de ces résultats est approximativement log-Normale, nous effectuons la moyenne géométrique de ces rendements (Tableau XVI).

Tableau XVI : Moyennes géométriques du rapport entre la quantité de *campylobacters* inoculée théorique et la quantité totale récupérée.

Modèle	Produits	C	V	S
Pénétration	0,27	0,36	0,34	0,13
Dispersion	0,69	0,55	0,83	0,70

Les rendements obtenus avec ces matrices sont comparables aux résultats de Fosse (52).

## 2.3 Résultats flore totale

Si la contamination par *Campylobacter* est le résultat d'une inoculation contrôlée, la flore mésophile présente est le résultat des différentes étapes, plus ou moins maîtrisées, de l'histoire de l'échantillon. Un traitement des résultats identique à celui réalisé pour le danger *Campylobacter* paraît donc intéressant dans la validation des modèles.

### 2.3.1 Echantillons témoins

Les valeurs individuelles de flore mésophile totale des témoins varient entre 2,7 et 8,8 log (UFC/échantillon), probablement du fait de la grande hétérogénéité d'approvisionnement en matrices carnées et de durée de conservation sous vide. Les valeurs moyennes des dénombrements de la flore totale pour les témoins varient de 5,7 à 8,5 log (UFC/échantillon) selon les produits (Figure 34). Ils sont peu influencés par la nature de la matrice ( $p=0,08$ ). Par contre, l'inclusion a un effet significatif ( $p=0,013$ ) particulièrement marqué. En effet, les témoins inclus présentent un niveau de contamination par la flore totale supérieur probablement lié au temps d'attente à

température ambiante et au réchauffement de la matrice lorsque l'agar est coulé chaud autour du carré de viande.

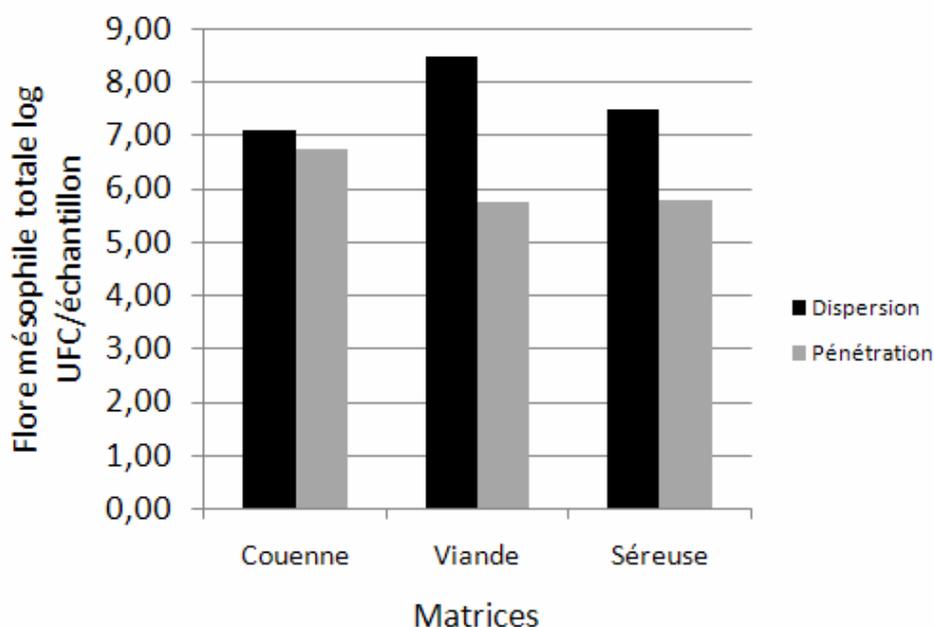


Figure 34 : Histogramme représentant la moyenne de la quantité de flore totale récupérée sur les trois compartiments des témoins selon la nature de la matrice et du modèle.

Des études évaluent la population bactérienne mésophile après abattage autour de 3 à 4 log UFC/g pour la viande bovine (62, 83, 104) et autour de 3 log/cm<sup>2</sup> sur carcasse de porc(114). Après une semaine sous vide, une étude montre que la flore totale à 25°C atteint 4 log UFC/g de viande bovine, ce qui est égal au niveau de contamination initial(83). Après quinze jours, la flore mésophile atteint 7log/g. Une autre étude, montre que pour une contamination initiale inférieure au seuil de détection, la population bactérienne mésophile atteint 1 log/cm<sup>2</sup> en 7jours, et 2 à 3log/cm<sup>2</sup> entre 7 et 15 jours. Nos résultats sont donc en moyenne plus élevés que ces données. La découpe, l'inclusion et la mise à 25°C sont probablement à l'origine d'un réchauffement expliquant cette augmentation de la population bacterienne.

### 2.3.2 Quantité totale de bactéries récupérées

La quantité totale de bactéries récupérées correspond à la somme des quantités dénombrées dans les trois compartiments. Les valeurs moyennes par matrice sont de **8,4 et 8,3** pour la Couenne, de 7,4 et 7,9 pour la Viande, de 7,4 et 7,4 log (UFC/échantillon) pour la Séreuse respectivement pour les modèles Pénétration et Dispersion. La dispersion des résultats est représentée Figure 35 par un box-plot.

Dans le modèle Dispersion et le modèle Pénétration, la quantité totale de bactéries récupérées est plus importante sur la matrice Couenne que sur la matrice Viande ( $p=0,06$  et  $p<0,0001$  respectivement) et que sur la matrice Séreuse ( $p=0,006$  et  $p<0,0001$  respectivement) (test T deux à deux). Les échantillons de la matrice « Couenne », qui ont été obtenus auprès du commerce local et manipulés dans un délai plus important après abattage apparaissent donc quantitativement plus contaminées.

Toutes matrices confondues, la contamination en flore totale est plus importante ( $p=0,01$ ) pour le modèle Dispersion (étape de réchauffement lié à l'inclusion dans l'agar).

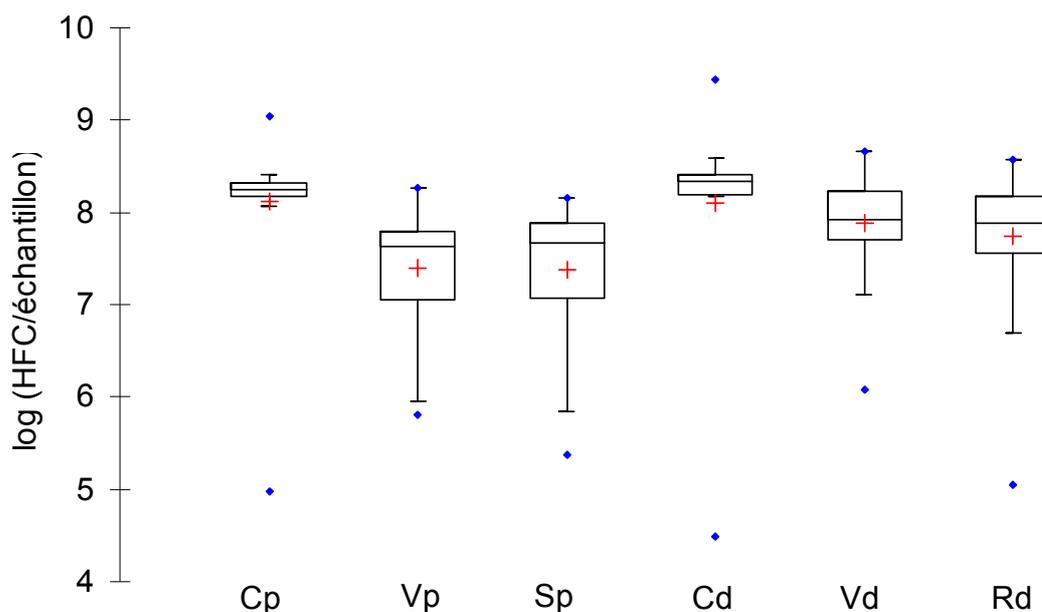


Figure 35 : Box-plot (minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum) représentant la quantité de *Campylobacter* totale récupérés selon la nature de la matrice et du modèle.

### 2.3.3 Modèle Pénétration

Les résultats bruts obtenus sont présentés en annexe D.

Pour les compartiments supérieurs dits « Papier », correspondant au papier absorbant déposé en surface (Figure 36) :

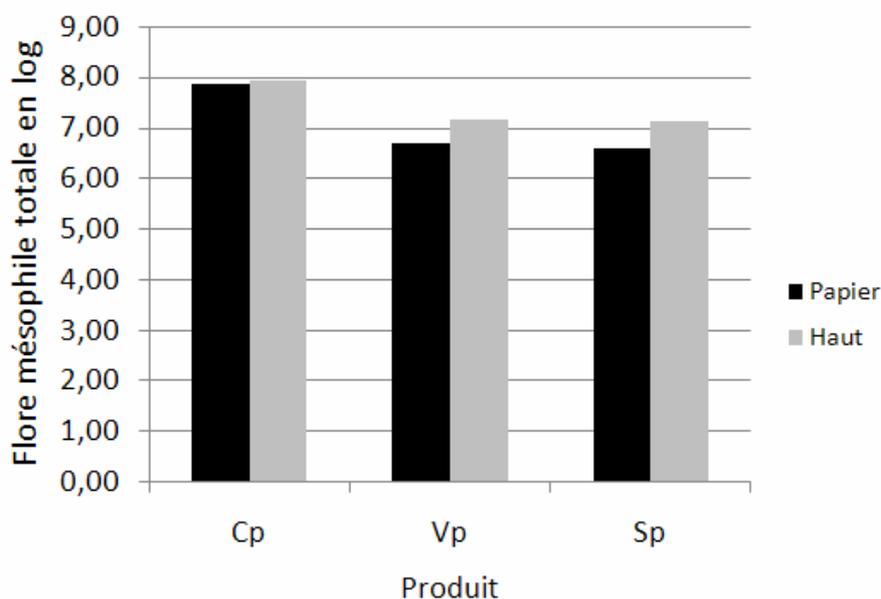


Figure 36 : Histogramme des moyennes de la quantité de flore mésophile totale récupérée selon le compartiment et la matrice en modèle Pénétration.

- Pour la Couenne, la quantité moyenne de *Campylobacter*s détectés est de 7,84 log UFC (minimum : 5,97 ; maximum : 8,63 ; écart-type : 0,43)
- Pour la Viande, de 6,70 (minimum : 5,04 ; maximum : 7,92 ; écart-type : 0,72)
- Pour la Séréuse, de 6,59 (minimum : 4,30 ; maximum : 7,58 ; écart-type : 0,95).

Pour les compartiments inférieurs dits « Haut » (Figure 36):

- Pour la Couenne, la quantité moyenne de Campylobacters détectés est de 7,91 log UFC (minimum : 4,98 ; maximum : 8,84 ; écart-type : 0,82)
- Pour la Viande, de 7,17 (minimum : 2,67 ; maximum : 8,00 ; écart-type : 0,89)
- Pour la Séreuse, de 7,11 (minimum : 4,13 ; maximum : 8,10 ; écart-type : 0,95).

Il existe (Figure 36) une différence significative entre la quantité moyenne pour la flore totale récupérée par le papier absorbant et la quantité moyenne pour la flore totale présente sur la couche supérieure, pour la Séreuse (6,6 et 7,1 log UFC/ech ;  $p = 0,006$ ) et la Viande (6,7 et 7,2 log UFC/ech ;  $p = 0,03$ ). Elle ne l'est pas pour la Couenne (7,8 et 7,9 log UFC/ech ;  $p = 0,58$ ).

### 2.3.4 Modèle Dispersion

#### • Quantité moyennes de bactéries détectées par compartiment

La moyenne de la quantité de bactéries dans chaque compartiment est présentée Figure 37 et les résultats numériques bruts sont présentés en annexe D.

Pour les compartiments dits « Rinqat », correspondant à la quantité de bactéries emmenées par le rinqat (Figure 37) :

- Pour la Couenne, la quantité moyenne de Campylobacters détectés est de 7,65 log UFC (minimum : 3,73 ; maximum : 9,18 ; écart-type : 1,03)
- Pour la Viande, de 7,21 (minimum : 5,43 ; maximum : 8,23 ; écart-type : 0,64)
- Pour la Séreuse, de 7,10 (minimum : 3,79 ; maximum : 8,12 ; écart-type : 0,85).

Pour les compartiments dits « Matrice » (Figure 37):

- Pour la Couenne, la quantité moyenne de Campylobacters détectés est de 7,77 log UFC (minimum : 3,81 ; maximum : 9,10 ; écart-type : 0,90)
- Pour la Viande, de 7,63 (minimum : 5,60 ; maximum : 8,52 ; écart-type : 0,57)
- Pour la Séreuse, de 7,46 (minimum : 3,74 ; maximum : 8,30 ; écart-type : 0,79).

Pour les compartiments dits « Agar » (Figure 37):

- Pour la Couenne, la quantité moyenne de Campylobacters détectés est de 7,23 log UFC (minimum : 4,27 ; maximum : 8,46 ; écart-type : 0,77)
- Pour la Viande, de 6,75 (minimum : 4,62 ; maximum : 7,71 ; écart-type : 0,72)
- Pour la Séreuse, de 6,80 (minimum : 4,82 ; maximum : 7,75 ; écart-type : 0,68).

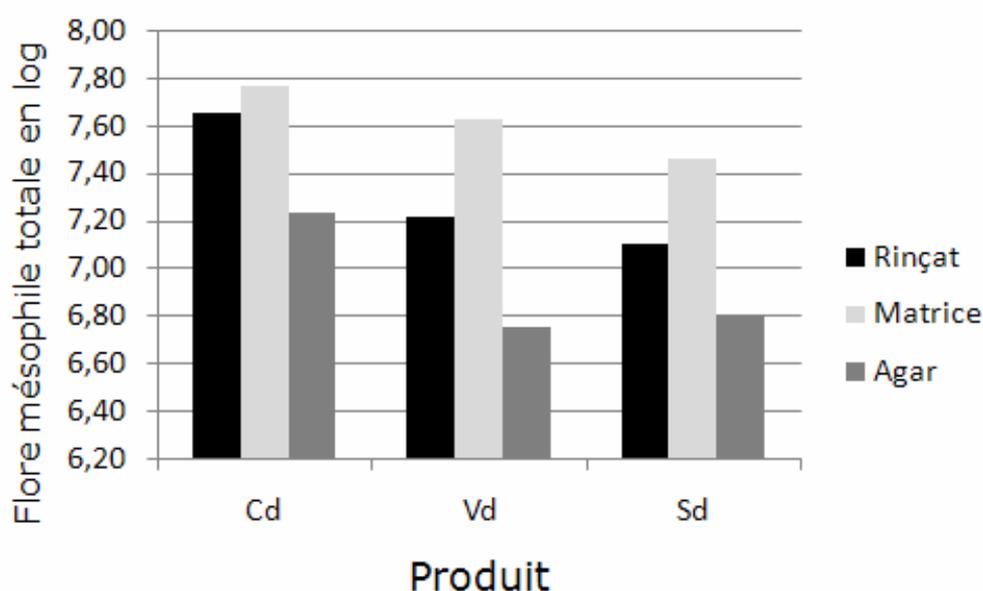


Figure 37 : Histogramme des moyennes de la quantité de bactéries mésophiles détectées selon le compartiment et la matrice en modèle Dispersion.

Nous avons réalisé un test T pour évaluer la significativité de la différence entre les moyennes obtenues dans chaque compartiment.

A matrice fixée :

- Pour la Couenne, il existe une différence significative entre la quantité moyenne de flore totale détectée dans l'Agar par rapport à celles des deux autres compartiments (Rinçat :  $p=0,007$  et Matrice :  $p=0,0002$ ). Les bactéries sont donc détectées préférentiellement et équitablement dans le compartiment Matrice et Rinçat.
- Pour la Viande et la Séreuse, il existe une différence significative entre les quantités moyennes de flore totale entre chaque compartiment. Les bactéries sont détectées préférentiellement dans la Matrice, puis dans le Rinçat et enfin dans l'Agar.

## 2.4 Ratios considérés

Nous avons considéré plusieurs variables pour interpréter nos deux modèles. Ce sont des variables relatives qui permettent de quantifier la répartition des bactéries dans les différents compartiments indépendamment de la quantité inoculée. Nous considérons la quantité totale de bactéries détectées, ce qui permet de comparer les deux flores. En effet, pour la flore totale, la quantité réelle présente initialement n'était pas connue.

### 2.4.1 Modèle Pénétration

Nous avons défini trois variables que nous avons calculées pour la flore mésophile totale et pour *Campylobacter* :

La variable « absorbé » correspond à la proportion de bactéries retenues par le papier posé en surface de la matrice à la fin du délai de contact.

$$\text{Absorbé} = \text{Papier} / (\text{Papier} + \text{Haut} + \text{Bas})$$

La variable « pénétré » correspond à la proportion de bactéries détectées sur la couche inférieure et donc considérées comme ayant traversé la couche supérieure du modèle.

$$\text{Pénétré} = \text{Bas} / (\text{Papier} + \text{Haut} + \text{Bas})$$

La variable « retenu » correspondant à la proportion de bactéries qui est restée sur la surface de la matrice, qui n'a pas été absorbée par le papier, et qui n'a pas pénétré en profondeur.

$$\text{Retenu} = \text{Haut} / (\text{Papier} + \text{Haut} + \text{Bas})$$

Quelles que soient les matrices, la variable Pénétré calculée est inférieure au seuil de détection, puisqu'aucune bactérie n'est détectée sur les compartiments du bas. La variable Absorbé est de ce fait égale à  $(1 - \text{Retenu})$ . Il n'est donc pas nécessaire de considérer les variables Absorbé et Pénétré en détail.

#### 2.4.1.1 Résultats *Campylobacter*

Entre 25 et 40% des campylobacters sont retenus sur la matrice inoculée après l'épongeage par le papier Whatmann (Figure 38). La matrice Séreuse retient moins les bactéries (0,23), que les matrices Couenne (0,38) et Viande (0,36), cette différence est faiblement significative ( $p \approx 0,06$ ). Les valeurs numériques caractérisant la dispersion des résultats sont détaillées en annexe D.

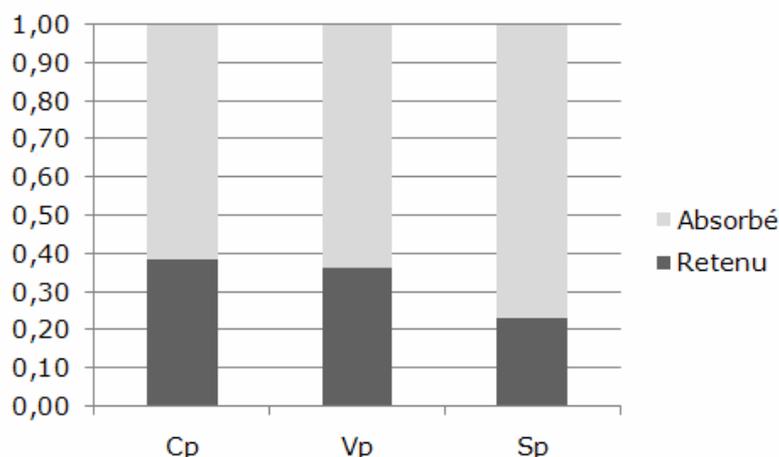


Figure 38 : Valeur des variables calculées (Absorbé, Retenu) pour les campylobacters en fonction des matrices pour le modèle Pénétration.

#### 2.4.1.2 Résultats flore totale

Entre 60 et 75% de la flore totale persiste sur la matrice (Figure 39), avec une persistance supérieure sur les matrices Viande (0,74) et Séréuse (0,73) que sur la matrice couenne (0,60), cette différence est significative au seuil de 5 %. Le détail des résultats est précisé en annexe D.

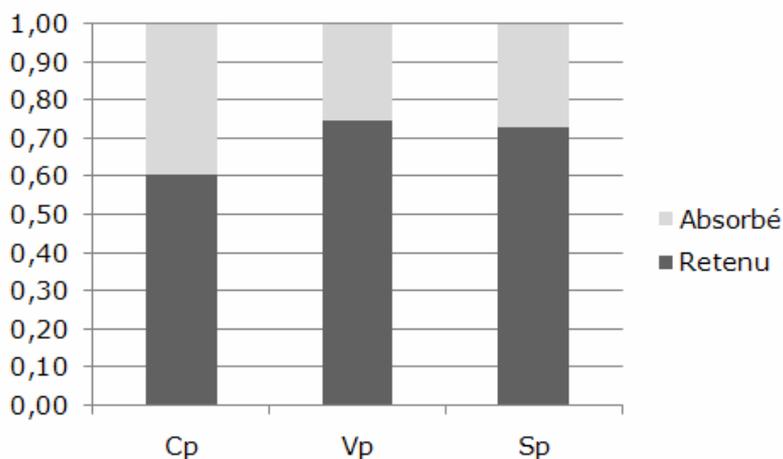


Figure 39 : Valeur des variables calculées (Absorbé, Retenu) pour la flore mésophile totale en fonction des matrices pour le modèle Pénétration.

#### 2.4.2 Modèle dispersion

Pour le modèle dispersion : nous avons considéré trois variables :

La variable « rincé », qui correspond à la proportion de bactéries lessivées par le rinçage et présentes dans le rinçat récupéré.

$$\text{Rincé} = \frac{\text{Rinçat}}{\text{Rinçat} + \text{Agar} + \text{Matrice}}$$

La variable « retenu », qui correspond à la proportion de bactéries restées et donc détectées sur la matrice après le rinçage.

$$\text{Retenu} = \frac{\text{Matrice}}{\text{Rinçat} + \text{Agar} + \text{Matrice}}$$

La variable « dispersé », qui correspond à la proportion de bactéries apportées sur l'agar du fait du rinçage.

$$\text{Dispersé} = (\text{Dispersé}) / (\text{Rinçat} + \text{Agar} + \text{Matrice})$$

Notons que pour ces calculs, les résultats de dénombrements inférieurs au seuil de détection ne sont pas comptabilisés comme des valeurs nulles mais comme des valeurs manquantes, ce qui nous apparaissait scientifiquement plus rigoureux. Ceci explique que la somme des moyennes des trois compartiments ne soit pas strictement égale à un.

#### 2.4.2.1 Résultats *Campylobacter*

Les résultats détaillés se trouvent en annexe D. Pour les matrices Couenne et Séreuse, plus de 60% des *Campylobacter* sont lessivés par le rinçat, autour de 20% persistent sur la viande et environ 15% sont dispersées sur l'agar. Pour la matrice Viande, 35% des *Campylobacter* sont retenus sur la matrice. Cette matrice a donc tendance à retenir plus les bactéries que les autres matrices. Cependant, comme pour les autres matrices, une grande partie des bactéries est lessivée.

Pour chacune de ces variables, la matrice Viande est significativement différente des matrices Couenne et Séreuse ( $p=0,04$ ) (Figure 40). Les différences entre les matrices Séreuse et Couenne ne sont, en revanche, pas significatives.

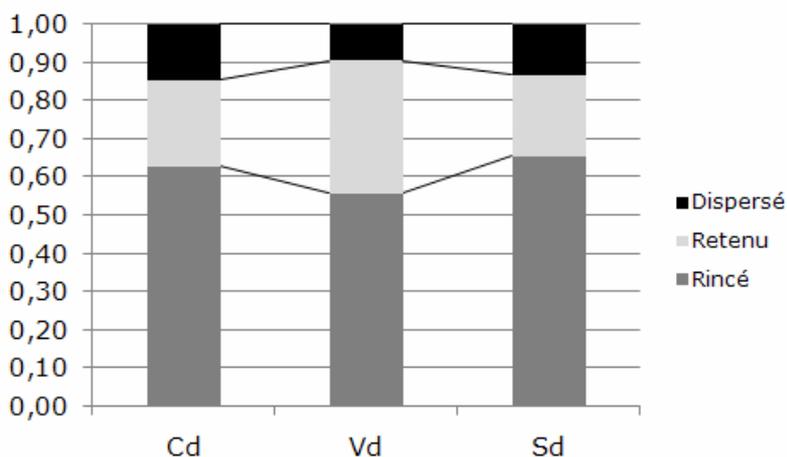


Figure 40 : Valeurs des variables Dispersé, Retenu, et Rincé calculées pour les campylobactères en fonction des matrices pour le modèle Dispersion

La valeur du ratio Retenu est inférieure à celle du ratio Retenu obtenu pour le modèle Pénétration, probablement du fait que l'action mécanique d'aspiration par le papier est plus modérée que celle du rinçage.

#### 2.4.2.2 Résultats flore totale

Les résultats détaillés sont présentés en annexe D. Pour la matrice Viande (Figure 41), la proportion de bactéries retenues par la viande dépasse les 60%. Pour les matrices Couenne et Séreuse, elle est de l'ordre de 50%. La proportion des bactéries lessivées représente environ 15%.

Nous remarquons que le comportement de la flore mésophile et des *Campylobacter* vis-à-vis des contraintes mécaniques imposées par le rinçage sont nettement différentes. En effet, la flore totale, présente à l'origine sur la viande a tendance à persister préférentiellement sur la viande (50-60%). A l'inverse, les *Campylobacter*, qui ont été inoculés sont plus facilement lessivés (60%). La flore totale adhère sans doute à la matrice de façon plus importante, puisqu'elle est présente depuis plus longtemps. Notons en revanche que la proportion de bactéries dispersées sur l'agar est similaire quelle que soit la nature de la flore étudiée.

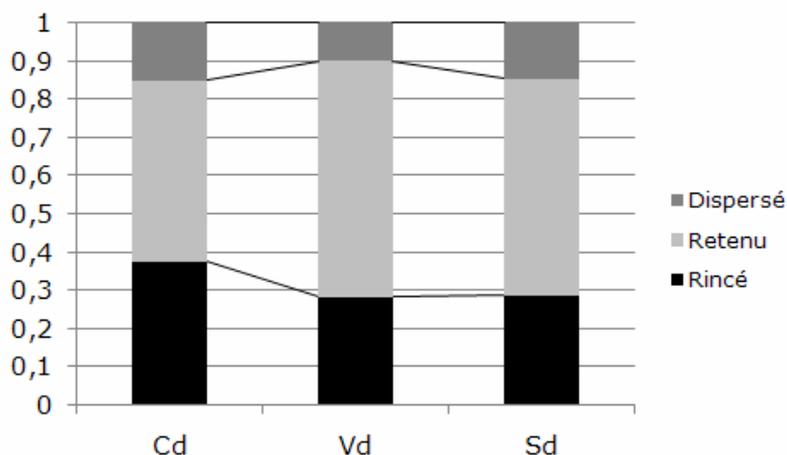


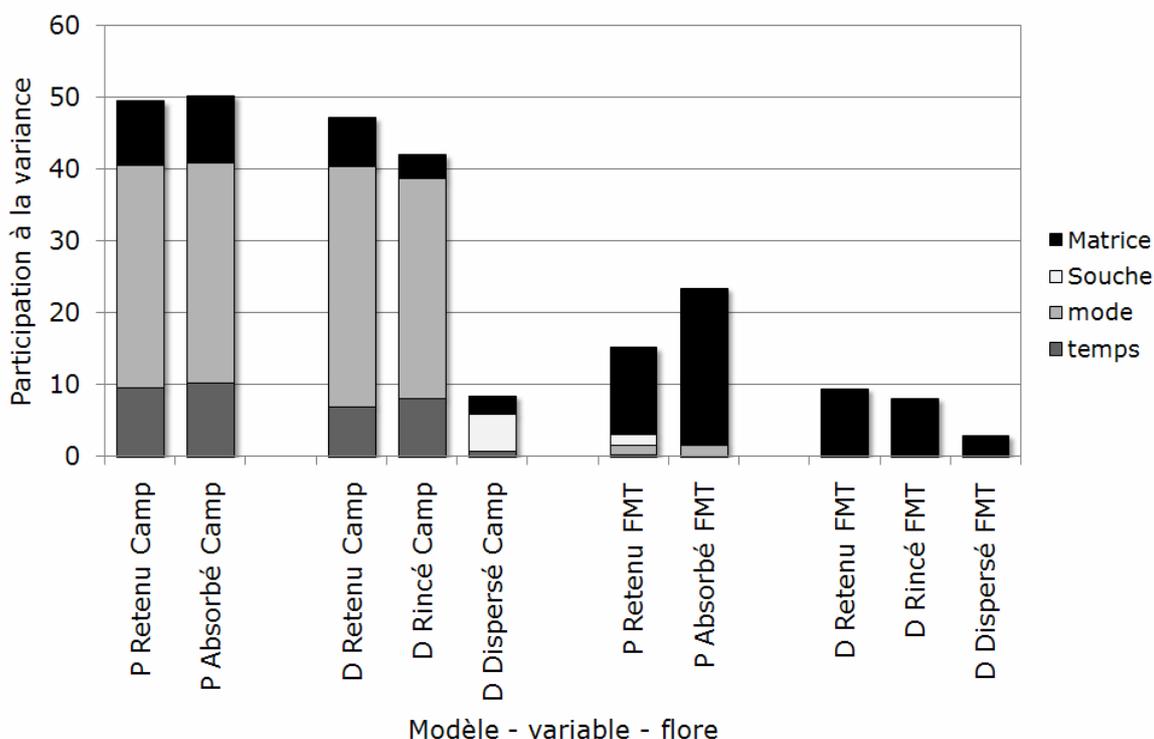
Figure 41 : Valeurs des variables Dispersé, Retenu, et Rincé calculées pour la flore totale en fonction des matrices pour le modèle Dispersion.

## 2.5 Facteurs de variation des ratios

Pour valider ces deux modèles, nous avons étudié l'influence de facteurs de variation sur la répartition des bactéries dans les différents compartiments que nous avons définis. Dans un premier temps, nous avons décomposé la variance en utilisant la procédure Varcomp du logiciel SAS. Puis, nous avons étudié l'influence des facteurs de variation sur ces variables en utilisant une ANOVA (Analyse de la Variance) dans le logiciel XLStat.

### 2.5.1 Composition globale de la variance

L'utilisation de la procédure SAS - Varcomp nous a permis d'évaluer l'importance relative de chacun des facteurs sur la variance des résultats obtenus (Figure 42).



Modèle : P : Pénétration ; D : Dispersion

Variable : Retenu, Rincé, Dispersé pour le modèle Dispersion ; Retenu et Absorbé pour le modèle Pénétration.

Flore: Camp : Campylobater ; FMT : flore mésophile totale.

Figure 42 : Représentation de la participation à la variance de chaque paramètre de variation étudié.

Cette analyse montre qu'une grande part de la variance n'est pas reliée aux facteurs étudiés. Cette part est particulièrement importante pour la flore mésophile totale (entre 75 et 97%) et pour la variable Dispersé pour le danger *Campylobacter* (91%).

Pour la flore mésophile totale, quelle que soit la variable et le modèle considéré, c'est la nature de la matrice qui a l'effet le plus marqué. La contribution des autres facteurs étudiés dans la variance est extrêmement faible (<2%).

En modèle Pénétration et pour le danger *Campylobacter*, la part de la variance liée à l'erreur est d'environ 50%. Puisque la variable Pénétré est considérée comme nulle, la somme de la variable Retenu et Absorbé est égale à 1. Par conséquent, leurs variations sont liées. La contribution de chaque effet à la variance est donc analogue : le mode de contamination est responsable de 31% de la variance, le temps de contact de 10% et la nature de la matrice de 9%. L'effet de la nature de la souche n'apparaît pas.

En modèle Dispersion, pour les variables Rincé et Retenu calculées pour le danger *Campylobacter*, la part de l'erreur est de l'ordre de 55%. L'influence des trois paramètres étudiés sur ces deux variables est comparable à celle obtenus pour les deux variables du modèle Pénétration. Pour la variable Dispersé (correspondant à la proportion de *Campylobacter* lessivés par le rinçage et déposés sur l'agar), le mode d'étalement ne participe pas à la variance ; le temps participe pour 1% ; la matrice pour 3% et la souche pour 5%.

Pour affiner notre interprétation, nous avons réalisé une analyse de variance pour chaque modèle, et une analyse stratifiée matrice par matrice. Ces analyses nous ont permis d'obtenir des précisions quant à l'influence quantitative de chaque modalité sur la variable. Les résultats de l'analyse stratifiée apportent dans notre cas peu d'informations complémentaires par rapport à l'analyse globale et sont, de ce fait, développés en annexe D. Cependant, certaines des valeurs obtenues apportent des précisions complémentaires intéressantes et sont rapportées à l'occasion de l'analyse par modèle.

L'influence d'un facteur est significative si la probabilité qu'il n'ait pas d'effet sur la variable quantitative considérée est inférieure à 5%.  $p$  est la probabilité pour que le facteur considéré n'ait pas d'influence significative. Cette analyse de variance est complétée pour les variables à plus de deux modalités par un test de Fisher pour les comparaisons par paire. Les différences significatives sont indiquées sur les histogrammes par des lettres différentes.

## **2.5.2 Analyse par modèle : modèle Pénétration**

### **2.5.2.1 Résultats *Campylobacter***

La quantité de campylobacters retenus est influencée par le temps de contact, le mode d'étalement et la nature de la matrice (Figure 43). L'effet de la nature de la souche n'apparaît pas ici.

Quand le temps de contact augmente, la proportion de *Campylobacter* retenus augmente. Pour la matrice Séreuse (Figure 43) et la matrice Viande (Figure 42), cette influence est particulièrement marquée, elle est plus faible pour la matrice Couenne ( $p = 0,10$ ).

Quand la surface de contact augmente, la proportion de *Campylobacter* retenus augmente. Le mode d'étalement a une influence significative sur la quantité de campylobacters qui persistent sur la couche supérieure pour les matrices Couenne et Viande (annexe D). Pour la matrice Séreuse cet effet est plus limité ( $p = 0,11$ ). Lorsque l'on étale l'inoculum, la persistance des bactéries est augmentée.

Enfin, la matrice Séreuse semble moins bien retenir les campylobacters que les autres matrices.

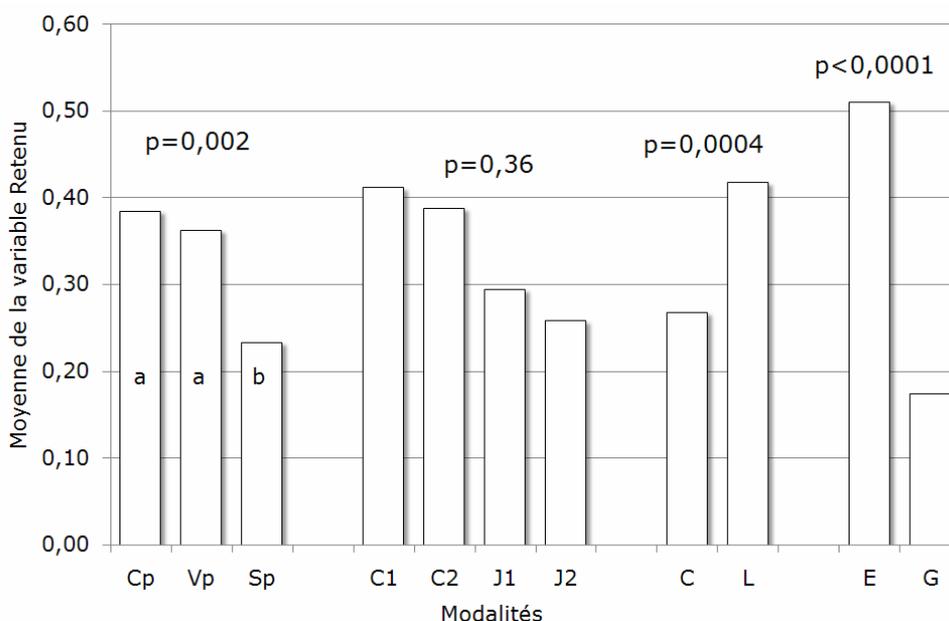


Figure 43 : Moyennes de la variable Retenu en fonction des facteurs de variations calculées pour les campylobacters pour le modèle Pénétration.

### 2.5.3.2 Résultats flore totale

Seule la nature du produit a une influence sur la flore totale retenue : la Couenne semble moins retenir la flore totale que les autres matrices (Figure 44). En analyse stratifiée, nous observons que pour la matrice Séreuse, il apparaît un effet de la souche de *Campylobacter* inoculée ( $p = 0,04$ ).

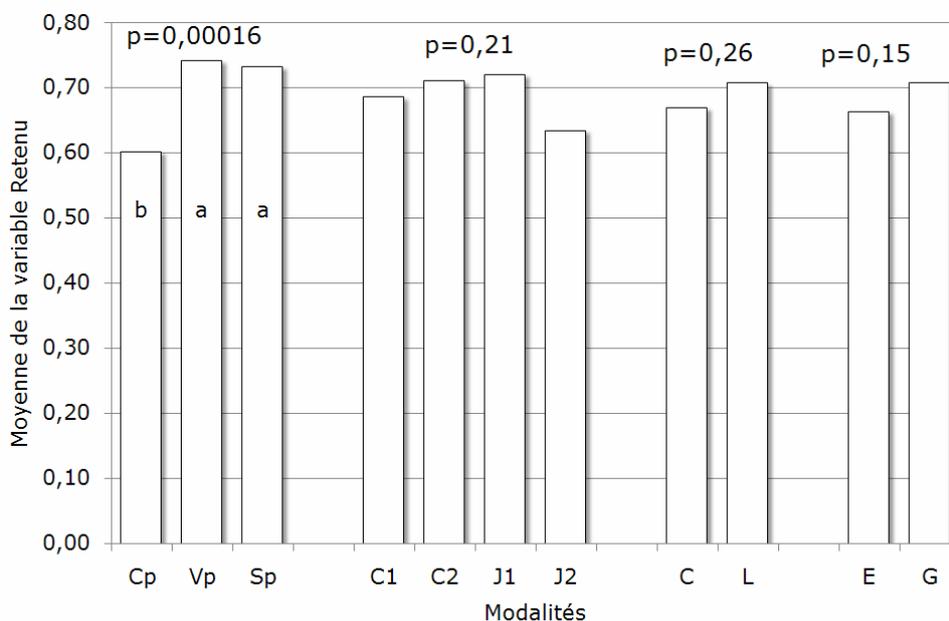


Figure 44 : Moyennes de la variable Retenu en fonction des facteurs de variations calculées pour la flore mésophile totale pour le modèle Pénétration.

Pour la flore inoculée, le temps et la surface de contact semble jouer un rôle quant à la quantité de bactéries retenues en surface. En revanche, aucun effet souche marqué ( $p > 0,05$ ) n'a pu être démontré. Les manipulations des échantillons n'ont pas d'effet particulier sur la flore totale présente.

## 2.4.4 Analyse par modèle : modèle Dispersion

### 2.4.4.1 Résultats Campylobacter

La quantité de *Campylobacter* retenue est influencée par le mode d'étalement ( $p < 0,0001$ ), le temps de contact ( $p = 0,0002$ ) et la nature de la matrice ( $p = 0,0003$ ) (Figure 45).

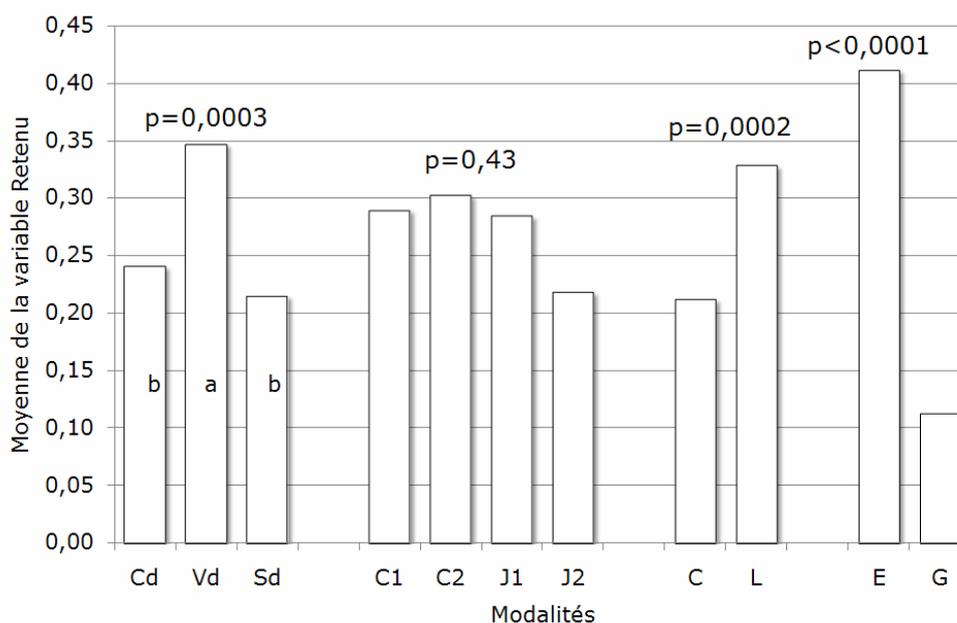


Figure 45 : Moyennes de la variable Retenu en fonction des facteurs de variations calculées pour les campylobacters pour le modèle Dispersion.

Plus la surface de contact est grande, plus la proportion de *Campylobacter* qui persistent sur la viande est grande et ce, quelle que soit la nature de la matrice.

Plus le temps de contact est élevé, plus la quantité de *Campylobacter* retenue est élevée. Cette différence n'est cependant pas significative pour la matrice Viande ( $p = 0,28$ ) (annexe D).

La matrice Viande retient de façon plus importante les campylobacters que les matrices Couenne et Séreuse ( $p = 0,0003$ ).

L'effet de la nature de la souche n'apparaît pas ici.

La proportion de campylobacters lessivés est influencée par le temps de contact ( $p < 0,0001$ ), le mode d'étalement ( $p < 0,0001$ ) et la nature de la matrice ( $p = 0,01$ ) de façon inverse par rapport à la variable Retenu (Figure 46). En analyse stratifiée, on observe cependant que le temps de contact n'a pas d'influence pour la matrice Viande. Sur la surface séreuse, la proportion de campylobacters lessivés est plus importante que sur les matrices Couenne et Viande (surface très lisse).

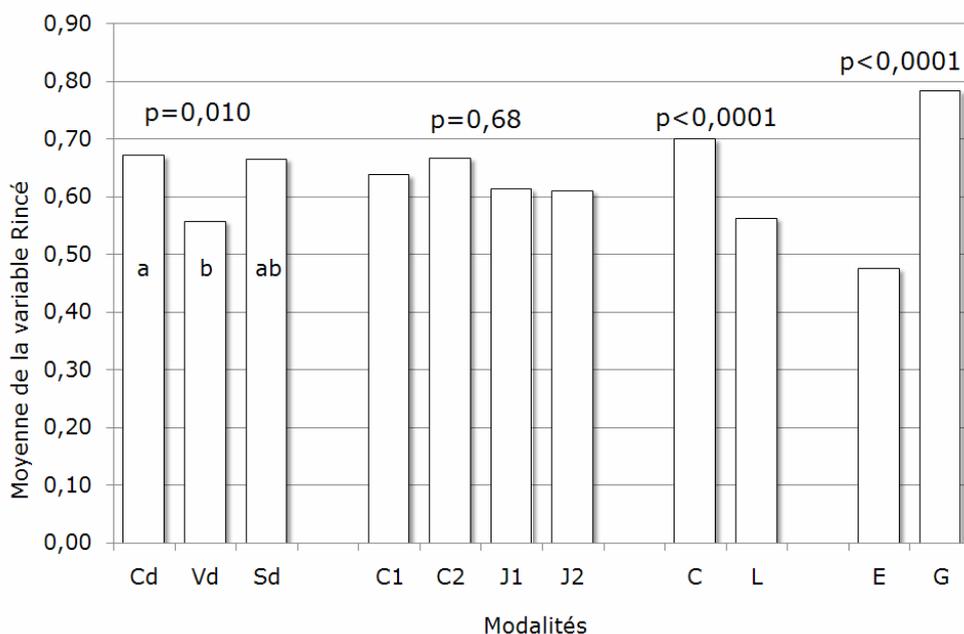


Figure 46 : Moyennes de la variable Rincé en fonction des facteurs de variations calculées pour les campylobacters pour le modèle Dispersion.

Seule la nature du produit influence la proportion de campylobacters dispersés (Figure 47). Les matrices Couenne et Séreuses sont significativement différentes. Nous mettons également en évidence un effet de la souche.

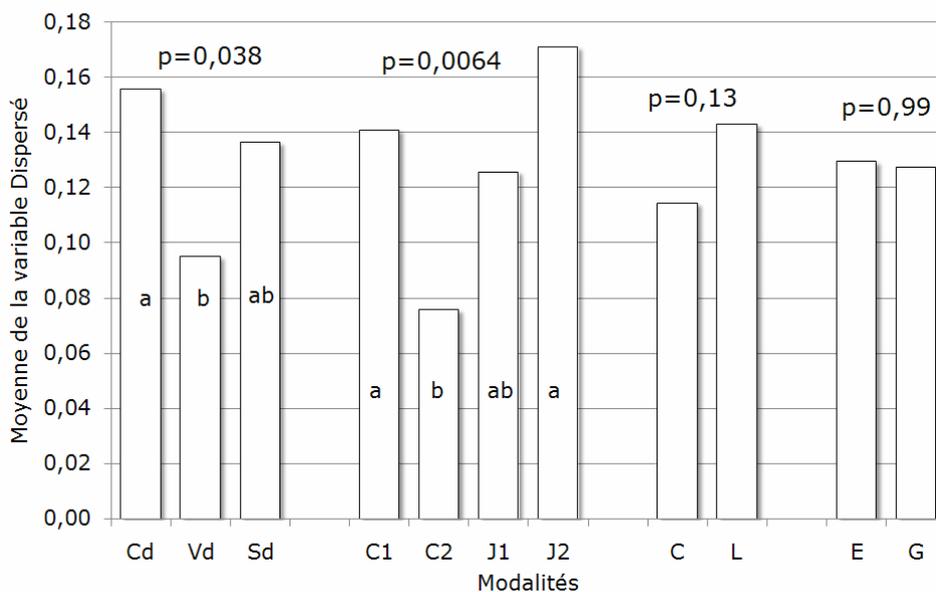


Figure 47 : Moyennes de la variable Dispersé en fonction des facteurs de variations calculées pour les campylobacters pour le modèle Dispersion.

#### 2.5.4.2 Résultats flore totale

Pour les trois variables Retenu, Rincé et Dispersé en flore totale, seule la nature du produit a une influence (Figures 48 à 50). La proportion de flore totale lessivée est significativement plus importante sur la Couenne. Sur la Séreuse, la proportion de flore totale Retenue est significativement moins importante et la proportion de flore totale dispersée significativement plus importante.

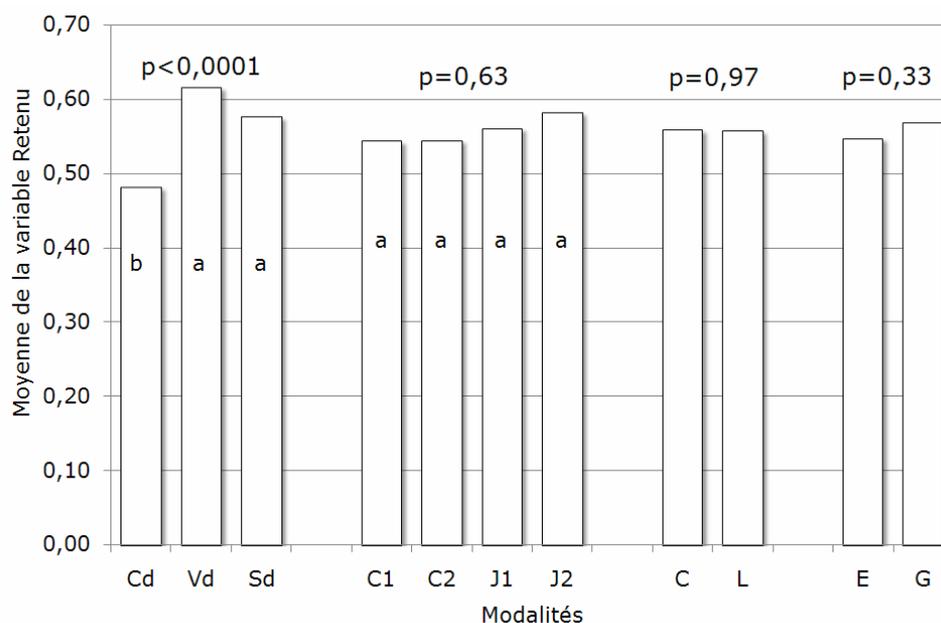


Figure 48 : Moyennes de la variable Retenu en fonction des facteurs de variations calculées pour la flore mésophile totale pour le modèle Dispersion.

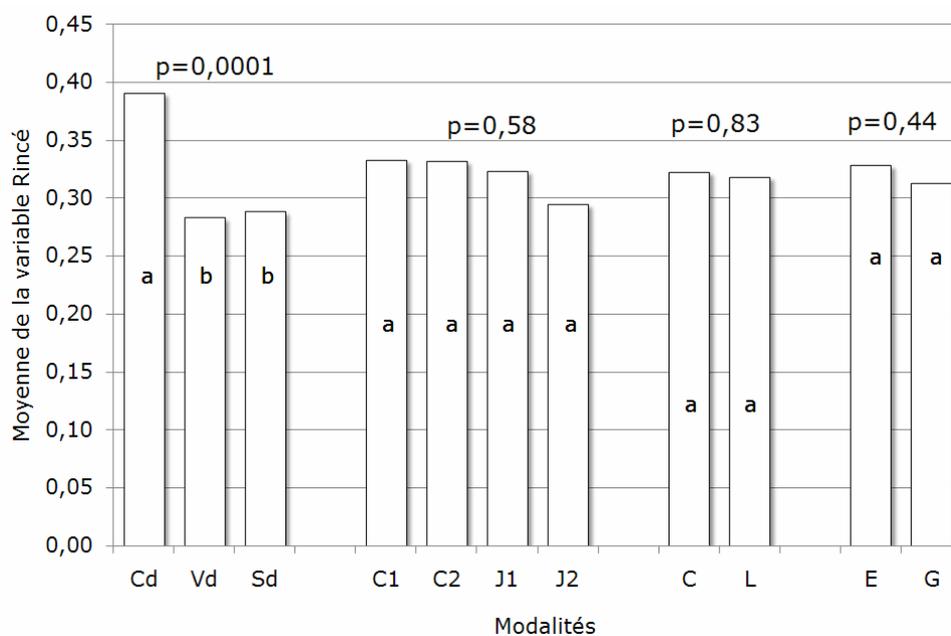


Figure 49 : Moyennes de la variable Rincé en fonction des facteurs de variations calculées pour la flore mésophile totale pour le modèle Dispersion.

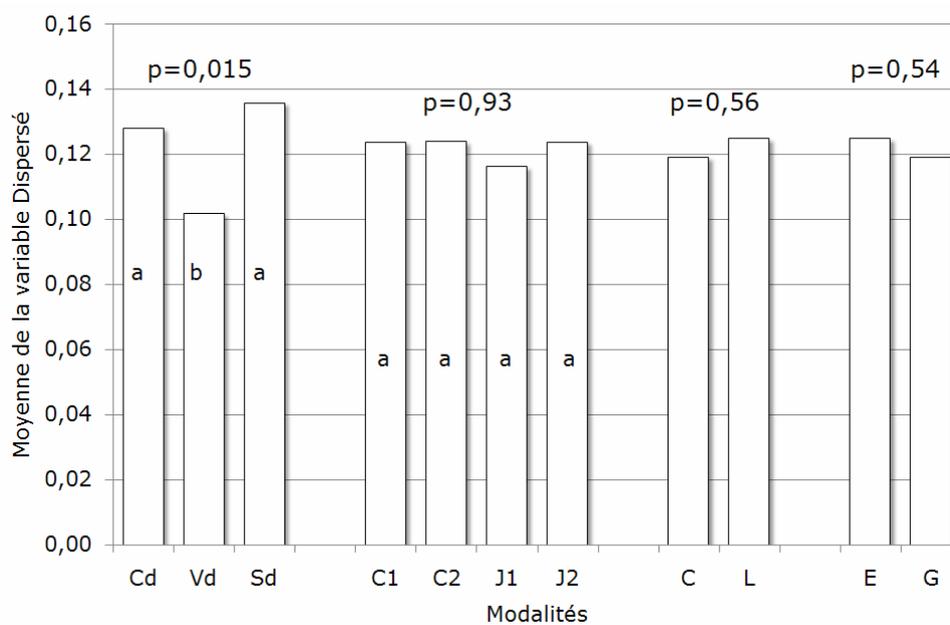


Figure 50 : Moyennes de la variable Dispersé en fonction des facteurs de variations calculées pour la flore mésophile totale pour le modèle Dispersion.

### 3. Discussion

L'objectif premier de cette étude était de concevoir un modèle d'étude de la contamination de la surface des viandes par des dangers bactériens, dont le réservoir naturel est le tube digestif des animaux abattus. Plusieurs questions se posent tant sur le plan cognitif que sur le plan d'une application pour la maîtrise en abattoir. Qu'en est-il d'une pénétration par les bactéries de la profondeur de la matrice ? Une éventuelle pénétration en profondeur pouvant d'une part modifier les conditions de survie du danger et d'autre part peut affecter les conditions de réalisation du retrait de la surface contaminée par le parage. Qu'en est-il de la capacité des bactéries à adhérer sur cette surface ? Cette capacité peut affecter d'une part la dispersion de la population bactérienne sur une surface plus grande du fait d'une aspersion (un douchage) et d'autre part la possibilité d'ôter de la surface contaminée les bactéries (par « un lessivage » ou par une absorption).

#### - *Choix d'une étude expérimentale et d'un témoin, deux modèles conçus*

Pour apporter des éléments de réponses, un témoin bactérien d'intérêt général par rapport à cette contamination d'origine digestive des viandes a d'abord été retenu. Il s'agit de *Campylobacter* thermotolérants. Cette bactérie est en effet d'intérêt car elle est d'une part un des dangers bactériens les plus fréquemment associés aux zoonoses alimentaires bactériennes liées à la consommation des viandes quelles qu'en soit les espèces. Mais surtout parce son réservoir naturel est uniquement le tube digestif des animaux à sang chaud avec un statut de contamination (fréquence du portage et niveau de contamination) très important chez toutes les espèces de production de chair. Le choix d'un modèle d'étude expérimental s'est ensuite fait face, notamment, aux difficultés d'envisager des essais d'inoculation en situation réelle d'abattage. Les limites d'un tel choix par rapport à une transposition à la situation réelle sont essentiellement dans le fait que la contamination a été provoquée par une inoculation d'une culture bactérienne pure et non d'un contenu digestif, et que l'aspersion (le douchage) s'est faite sur une surface de viande en position horizontale et non pas en position verticale, position des carcasses suspendues par le membre postérieur en général.

Du fait de contraintes techniques bactériologiques, il n'est pas possible de répondre simultanément avec le même modèle à la question de la dispersion suite à une aspersion et à celle de la pénétration en profondeur de la matrice contaminée. C'est pourquoi pratiquement deux modèles ont été conçus. L'un (le modèle dit « modèle pénétration ») a permis d'évaluer la pénétration des bactéries en profondeur d'une matrice carnée, le second (modèle dit « modèle dispersion ») a permis d'évaluer la dispersion des bactéries en surface suite à un rinçage ou à une aspersion d'eau. Dans le projet initial, l'utilisation alternative d'une matrice papier (Whatman® 3MM) avait été envisagée. Celle-ci ne s'est pas révélée satisfaisante, dans la mesure où les résultats obtenus ont été très différents de ceux sur les matrices carnées et incohérents. Ce modèle a donc été abandonné et n'a pas été présenté dans ce manuscrit.

La construction de ces deux modèles a permis par la détection et le dénombrement de quantifier les proportions de bactéries témoins présentes dans les différents compartiments après un délai de contact entre le contaminant (ici la bactérie témoin) et la surface de la matrice et après une action visant à « éliminer » cette bactérie, soit l'aspersion avec de l'eau (rinçage), soit l'absorption (par le papier), soit enfin le retrait (le parage) sur une certaine épaisseur de la surface (compartiment « haut » du modèle pénétration). Ces mesures nous ont permis de « quantifier » les capacités « d'adhésion » sur matrices carnées de *Campylobacter* thermotolérants et des

deux espèces *C. jejuni* et *C. coli*. En effet, de façon générale la proportion de bactéries retenues sur une viande résulte du développement d'une certaine « adhésion » de ces bactéries vis-à-vis de la matrice. Or les données bibliographiques montrent que l'adhésion peut être considérée comme un mécanisme divisible en deux étapes : une étape d'adhésion réversible suivie d'une étape d'adhésion irréversible (107). Ici avec nos modèles, l'adhésion réversible a pu être évaluée avec différents niveaux : bactéries peu adhérentes (bactéries détachées par le rinçage ou l'absorption par le papier), fermement adhérentes (bactéries détachées de la matrice par le stomachage) et adhérentes de façon irréversible (164).

Ces mesures ont reposé sur l'utilisation des techniques microbiologiques classiques (détection par culture sur gélose et dénombrements sur gélose). Celles-ci en raison de l'incertitude qui leur est propre pourraient être complétées par des techniques de biologie moléculaire telle que la PCR quantitative. Néanmoins, à ce jour la PCR quantitative appliquée directement sur matrice carnée reste non performante. Ainsi en complément de nos analyses microbiologiques, pour quelques échantillons, nous avons testé une méthode de PCR quantitative afin d'évaluer la quantité de *Campylobacter* dans les différents compartiments. Les résultats obtenus ont été relativement satisfaisants pour la matrice Couenne et le Papier mais totalement incohérents pour les matrices « viande », c'est-à-dire le muscle recouvert d'une aponévrose (séreuse péritonéale ici) et le muscle non recouvert d'une séreuse. Ces résultats sont concordants avec de précédents essais de détection par technique PCR de *Campylobacter* sur des matrices carnées porcines montrant une détection peu sensible mais possible sur la matrice couenne mais une absence de détection sur les matrices musculaires (54).

Le choix volontaire d'un modèle de matrices carnées non stériles a été fait pour se rapprocher au plus de l'écologie microbienne d'une viande en conditions réelles. Néanmoins, nous avons pu constater que du fait de notre protocole (stockage sous-vide, temps assez long d'une expérimentation) le niveau moyen de contamination vis-à-vis de la flore mésophile aérobie 30°C des matrices était plus élevé que les données bibliographiques (62, 83, 104). En effet, quelle que soit la matrice, la flore totale récupérée sur nos échantillons était comprise en 7 et 8 log UFC/ échantillon. Ce niveau de contamination est plus proche de celui observé sur les viandes en fin de chaîne de production, c'est-à-dire au stade de la distribution. En effet, lors de ses expérimentations sur des matrices carnées de même nature (couenne, muscles) achetées chez le distributeur, Fosse a mesuré un niveau moyen de contamination de 6,4 log UFC/ 25 cm<sup>2</sup>. Par rapport aux niveaux expérimentaux d'inoculation utilisés, ce niveau « élevé » n'affecte pas significativement les rendements de récupération de *Campylobacter* (54). De même il semble que *Campylobacter* puisse adhérer et survivre sur les matrices carnées avec une flore totale élevée (54, 96, 145)

Quel que soit le modèle ou la variable analysée, l'effet « souche » qui pouvait être suspecté du fait de données bibliographiques évoquant des différences significatives entre *C. jejuni* et *C. coli* d'une part et entre souches au sein d'une espèce d'autre part, que ce soit pour l'étude *in vitro* des capacités à adhérer sur surface inerte (149), ou pour l'étude des capacités de survie (96), n'a pas été montré ici. Certes peu de souches différentes ont été testées mais ce sont pour trois des quatre souches, les mêmes que celles étudiées par Sulaeman et ses collaborateurs (149). Il semble donc que sur matrices carnées pour les temps de contact étudiés et pour les deux aspects mesurés : la pénétration et l'adhésion « réversible », une prise en compte globale du danger *Campylobacter* thermotolérant, sans différence entre les espèces, *jejuni* et *coli*, soit suffisante.

- *Le témoin d'une contamination d'origine digestive, Campylobacter, ne migre pas en profondeur de la matrice contaminée et persiste en partie à la surface*

L'utilisation du modèle « Pénétration » ne nous a pas permis de mettre en évidence une pénétration de *Campylobacter* en profondeur pour les trois matrices carnées utilisées. Du fait des délais de contact courts utilisés (2h au maximum) l'absence d'une migration détectable des bactéries dans la profondeur de la matrice était attendue. Et ce d'autant que des données bibliographiques obtenues avec des temps de contact bien plus longs, avec d'autres genres bactériens, ne montrent pas de pénétration (4 jours pour (66); 28 jours pour (60)). Ces données renforcent donc l'hypothèse de l'absence d'une contamination significative en profondeur de la viande lors d'une projection à sa surface d'un contenu digestif et confirment le rôle protecteur des tissus conjonctifs notamment la séreuse et la peau. En effet, l'absence de détection des bactéries dans le compartiment « bas » ne tient pas ici à un manque de sensibilité de la méthode puisque le seuil de détection est très bas (10 UFC/compartiment). Il apparaît donc que sur une épaisseur d'environ 0,5 cm, *Campylobacter* thermotolérant ne pénètre pas la matrice contaminée quelle que soit cette matrice. Un parage sur une épaisseur *a minima* équivalente à celle du compartiment « haut » de notre modèle (0,5 cm), paraît suffisante pour assurer le retrait de la surface contaminée et ce quelle que soit la matrice (couenne, viande avec séreuse et viande sans séreuse). Néanmoins les règles d'hygiène concernant sa réalisation doivent être respectées.

- *Campylobacter persiste en surface des viandes*

Nos deux modèles montrent, quelle que soit la matrice et quel que soit le mode envisager pour « éliminer » de la surface ces bactéries (absorption par le papier ou rinçage par l'eau) qu'une fraction de la population de *Campylobacter* inoculés « adhère » à la surface de la matrice. La quantité retenue (variable « retenue » des deux modèles) sur la matrice carnée est de l'ordre de 20% de la quantité inoculée. Néanmoins elle varie en fonction de la nature de la matrice (par quantité décroissante : la séreuse, la couenne, la viande) et du temps de contact.

La nature de la matrice et plus particulièrement de sa surface a déjà été identifiée comme un facteur de variation des capacités à « décrocher » les bactéries (54, 101, 145). Il apparaît dans notre étude que le sens de ces variations est le même, les campylobacters persistent plus sur la matrice « Viande » (35% de campylobacters retenus en moyenne) que sur la matrice « Couenne » (24% de campylobacters retenus en moyenne) et la matrice Séreuse (22% de campylobacters retenus). La structure physique de la surface notamment la présence à l'échelle microscopique d'irrégularités (101) mais aussi la composition chimique peuvent expliquer ces observations. Ainsi lorsque la surface du muscle est privée de ses enveloppes, celle-ci est susceptible de retenir plus les bactéries en général. Cette hypothèse est par ailleurs étayée par les observations d'une persistance en proportion plus importante de la flore aérobie mésophile sur la matrice « Viande » (62% de bactéries retenues en moyenne) et la matrice Séreuse (57% de bactéries retenues en moyenne) que sur la matrice « Couenne » (47% de bactéries retenues en moyenne).

La proportion de campylobacters retenus dépend du délai et de la surface de contact. Lorsque le temps et la surface de contact augmentent, la proportion de campylobacters retenus augmente. Cette influence de la surface de contact sur l'adhésion des bactéries et de *Campylobacter* peut être évoquée. Il pourrait s'agir d'un

encombrement stérique de la surface et de « ses récepteurs » par un excès de bactéries. Ces phénomènes d'encombrement stérique des récepteurs sont bien connus dans les techniques immunologiques notamment.

La persistance moyenne en surface de 20% à 30% de la population de *Campylobacter* ayant contaminé les matrices, quelle que soit l'action corrective mise en œuvre pour réduire cette contamination de surface (rinçage ou absorption), est donc à prendre en compte pour l'analyse du risque de survie et d'atteinte de la dose infectante pour le consommateur. Dose faible, rappelons le pour *Campylobacter* (quelques centaines de bactéries / homme).

- - Le rinçage à l'eau de la surface contaminée abaisse mais disperse aussi la contamination bactérienne

- Le modèle « Dispersion » montre qu'un rinçage à l'eau de la surface contaminée lessive une partie des campylobacters inoculés en surface et ce quelle que soit la matrice carnée. Une partie, quantitativement importante (60% environ) est emportée dans le liquide de rinçage alors qu'une faible partie est dispersée autour de la zone initialement contaminée (20%).

L'efficacité du douchage pour réduire le niveau de contamination de la surface carnée peut être ici discutée. En effet, quelques données sont disponibles sur la réduction d'une population bactérienne sur une surface carnée contaminée, c'est-à-dire une estimation de la fraction de la population qui a été entraînée par le rinçage. Pour *Campylobacter*, cependant, les seules données disponibles sont acquises sur de la peau de poulet. Elles montrent une réduction de la population de *Campylobacter* inoculés de 0,84 à 1,08 log ufc/cm<sup>2</sup> (166) après un traitement de la matrice par immersion dans de l'eau à 80 – 85°C. Nos résultats sont plus faibles (la diminution de la population de campylobacters suite au rinçage est de l'ordre de 0,24 log UFC/échantillon pour la Couenne) mais l'eau que nous avons utilisée était à température ambiante. Pour la flore totale, la comparaison avec les valeurs des variables « retenues » observées dans les deux modèles de ces mêmes échantillons montre des différences avec *Campylobacter*. En effet, la proportion de bactéries de la flore aérobie mésophile retenues sur la matrice carnée est significativement plus importante, de l'ordre de 50-60%. Il y a donc par ce rinçage un effet moindre de réduction de la population bactérienne pour la flore totale. Nos résultats s'approchent ici de ceux obtenus par différentes études traitant de l'effet d'un douchage de la surface de carcasses avec de l'eau froide sous pression ou de l'eau à 35°C à basse pression (23, 87). La diminution de la population bactérienne mesurée dans ces études est de l'ordre de 0,45 log. Dans notre étude la diminution de la population de la flore totale observée sur les matrices carnées est en moyenne de 0,3 log. Le « douchage » étant réalisé à faible pression dans notre modèle, ce qui peut expliquer que ce résultat correspond à la zone inférieure des données disponibles. La différence d'efficacité quant à l'élimination des bactéries d'une surface carnée entre la flore totale et une population de bactéries d'un genre déterminé, comme *E. coli* ou salmonelles, est également rapportée dans les différentes études portant sur des procédés de décontamination des surfaces par l'eau chaude que ce soit en pulvérisation sous pression, sous vapeur ou par immersion : réduction de 4 log pour salmonelles, *E. coli* O157/H7 inoculés versus 1,3 log pour la flore totale sur des matrices bovines (5, 23) ; réduction de *Campylobacter* de 1,37 log UFC/cm<sup>2</sup> versus 0,75 log UFC/cm<sup>2</sup> pour la flore totale sur peau de poulet (87). Ces résultats suggèrent donc des différences de capacités « d'adhésion » à la surface de la matrice carnée en fonction des genres bactériens et particulièrement des pathogènes. Il apparaît donc la nécessité de développer un modèle qui pourrait être utilisé pour l'évaluation quantitative d'autres

dangers bactériens notamment *E. coli* shigatoxinogènes. Notre modèle est à ce titre compatible.

Enfin, il peut être aussi évoqué dans notre étude un temps de contact bien plus long de la flore totale aérobie avec la matrice que celui des campylobacters inoculés, temps de contact dont nous avons vu l'effet sur l'adhésion des bactéries (voir discussion supra).

Il est à noter que l'absorption par le papier (utilisée dans le modèle « pénétration ») est moins efficace pour réduire le niveau de contamination de la surface inoculée que le rinçage à l'eau. L'utilisation du papier pourrait s'apparenter à un chiffonnage « doux » de la surface. Or il a été déjà montré une moins bonne capacité de récupération des bactéries à partir de surfaces complexes comme les surfaces carnées et notamment les surfaces de type « viande » (54).

Il ne sera pas possible ici de comparer les données sur la dispersion des *Campylobacter* mais aussi de la flore totale sur une surface plus grande que la zone initialement contaminée du fait du rinçage à l'eau. En effet, à ce jour nous n'avons à notre connaissance aucune donnée bibliographique. En pratique il apparaît que l'action du rinçage mobilise une grande partie des bactéries inoculées (*Campylobacter*) ou initialement présentes (flore totale). Les bactéries entraînées dans le rinçat se répartissent en partie sur les surfaces voisines (compartiment « gélose » positif dans le modèle « dispersion »). Cette répartition sur les surfaces voisines dépend peu du mode de contamination, que ce soit en spots ou après étalement mais dépend du genre bactérien (voir supra différences de persistance sur la surface entre *Campylobacter* et la flore totale mésophile). Ces résultats suggèrent que lors d'un douchage d'une zone contaminée d'une carcasse sans aspiration simultanée du rinçat obtenu, l'écoulement du rinçat le long de la carcasse va augmenter la surface contaminée de cette carcasse. Par ailleurs ce liquide de rinçage, lui même contaminé doit être, sur un plan de maîtrise de la contamination de l'environnement, traité en conséquence. Enfin, il apparaît qu'un tel douchage masque des souillures macroscopiques qui pourraient alerter sur un risque élevé de contamination bactérienne, et ce d'autant que microscopiquement le danger persiste comme nous l'avons vu précédemment.

**Conclusion**

## Conclusion

La contamination d'origine digestive des viandes lors de l'abattage constitue un risque majeur d'introduction sur les surfaces des viandes de dangers zoonotiques bactériens alimentaires. *Campylobacter* est aujourd'hui à l'origine de la zoonose bactérienne la plus fréquente en Europe. Si les modalités de la contamination digestive sont bien connues, très peu de données sont disponibles quant à l'évolution des populations bactériennes mobiles en surface des carcasses après ce transfert, ainsi que sur les moyens de maîtriser cette évolution. Or cette évolution conditionne le statut de dangerosité de la denrée et donc les modalités de la correction.

Pour assurer un niveau élevé de sécurité du consommateur, des méthodes correctives ont par conséquent été instaurées. En Europe, les méthodes correctives chimiques sont interdites. Le parage est la seule méthode réglementairement explicitement autorisée, mais son principal inconvénient est la dévalorisation économique qu'il entraîne. Certaines pratiques à la limite de la législation comme un rinçage en surface à l'aide d'une « douchette » ont vu le jour, sans que leurs conséquences sur le plan microbiologique en soient connues.

Dans ce contexte, il nous a paru nécessaire d'étudier l'évolution sur des matrices carnées de la population d'un témoin d'une contamination d'origine digestive, *Campylobacter* thermotolérant, et d'une flore aérobie mésophile 30°C. Au travers de l'élaboration d'un modèle expérimental, nous avons choisi d'envisager la caractérisation de la contamination digestive selon deux angles : celui de la pénétration des bactéries en profondeur de la matrice et celui de la dispersion des bactéries suite à un rinçage à l'eau à basse pression et à température ambiante. Du fait de contraintes bactériologiques deux modèles ont du être conçus.

Ces deux modèles ont été développés sur 339 échantillons représentant les trois matrices carnées testées : la couenne, le muscle recouvert d'une séreuse (le péritoine), le muscle non recouvert d'une séreuse. Cinq variables ont été calculées à partir de dénombrements bactériens dans les 5 compartiments créés : la variable « absorbé », « retenu », « pénétré », « rincé » et « dispersé ».

Nous avons montré qu'il n'existait pas de pénétration des bactéries en profondeur (au-delà de 0,5 cm de la surface) de la matrice. Le parage maîtrisé selon les bonnes pratiques hygiéniques apparaît comme la méthode la plus efficace pour assurer le retrait de toute denrée dangereuse. Le douchage à l'eau masque les souillures macroscopiques, réduit partiellement et de façon variable la population présente mais surtout conduit à un risque majeur de dispersion des contaminants. Sur un plan plus cognitif, il est à noter qu'aucune différence de comportement vis-à-vis de l'adhésion réversible dans des temps de contact aussi courts (maximum deux heures) n'a été observée en fonction des deux espèces, *C. jejuni* et *C. coli*.

Enfin, les différences de comportement observées entre la flore totale et la population de *Campylobacter* amènent à ne pas généraliser le comportement de *Campylobacter* à tous les genres bactériens, et de ce fait, à proposer pour une analyse scientifique des risques l'utilisation d'un tel modèle pour caractériser le comportement d'autres dangers bactériens à note de risque élevé, notamment les *Escherichia coli* shigatoxinogènes, danger par ailleurs capable de se multiplier en surface de la viande à température ambiante.

## Références bibliographiques

## Bibliographie

1. **Afssa.** 2007. Avis de l'Afssa sur un projet de Règlement relatif à la décontamination des carcasses de volailles. Saisine n° 2006-SA-0125.
2. **Allerberger, F., N. Al-Jazrawi, P. Kreidl, M. P. Dierich, G. Feierl, I. Hein, and M. Wagner.** 2003. Barbecued chicken causing a multi-state outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis. *Infection* **31**:19-23.
3. **Association Nationale Interprofessionnelle du Bétail et des Viandes, I., and F. Fédération Nationale des Exploitants d'Abattoirs Prestataires de Services.** 1994. Bonnes pratiques d'abattage, Analyse des risques pour l'abattage hygiénique des gros bovins.
4. **Bae, W., K. N. Kaya, D. D. Hancock, D. R. Call, Y. H. Park, and T. E. Besser.** 2005. Prevalence and Antimicrobial Resistance of Thermophilic *Campylobacter* spp. from Cattle Farms in Washington State. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:169-174.
5. **Barkate, M. L., G. R. Acuff, L. M. Lucia, and D. S. Hale.** 1993. Hot water decontamination of beef carcasses for reduction of initial bacterial number. *Meat Science* **35**:p. 397-401.
6. **Barone, R.** 2000. Anatomie comparée des mammifères domestiques, Tome 2: Arthrologie et myologie. 4eme édition.
7. **Beery, J. T., M. B. Hugdahl, and M. P. Doyle.** 1988. Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2365-2370.
8. **Bell, A. E., R. T. Marshall, and M. E. Anderson.** 1986. Microbiological and sensory tests of beef tested with acetic and formic acid. *Journal of Food Protection* **49**:p. 207-210.
9. **Benenson, A.** 1990. Control of Communicable Disease in Man. 15th Edition.
10. **Berrang, M. E., and J. A. Dickens.** 2000. Presence and Level of *Campylobacter* spp. on Broiler Carcasses Throughout the Processing Plant. *Journal of Applied Poultry Research* **9**:43-47.
11. **Berrang, M. E., J. A. Dickens, and M. T. Musgrove.** 2000. Effects of hot water application after defeathering on the levels of *Campylobacter*, coliform bacteria, and *Escherichia coli* on broiler carcasses. *Poultry Science* **79**:1689-1693.
12. **Berrang, M. E., J. K. Northcutt, and J. A. Dickens.** 2004. The contribution of airborne contamination to *Campylobacter* counts on defeathered broiler carcasses. *Journal of Applied Poultry Research* **13**:1-4.
13. **Berry, E. D., and M. Koohmaraie.** 2001. Effect of different levels of beef bacterial microflora on the growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on beef carcass tissue. *Journal of Food Protection* **64**:1138 - 1144.
14. **Bhaduri, S., and B. Cottrell.** 2004. Survival of Cold-Stressed *Campylobacter jejuni* on Ground Chicken and Chicken Skin during Frozen Storage. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:7103-7109.
15. **Bolder, N. M.** 1997. Decontamination of meat and poultry carcasses. *Trends in Food Science & Technology* **8**:221-227.
16. **Booth, I. R.** 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological Review* **49**:p. 359-378.
17. **Buchanan, R. L.** 2005, posting date. Pathogen modeling program v. 7.0. [Online.]
18. **Buchanan, R. L.** 1991. Using Spreadsheet Software for Predictive Microbiology Applications: . *Journal of Food Safety* **11**:123-134.
19. **Butzler, J. P., and M. B. Skirrow.** 1979. *Campylobacter Enteritis*. *Clinics in Gastroenterology* **8**:737-765.
20. **Calicioglu, M., C. W. Kaspar, D. R. Buege, and J. B. Luchansky.** 2002. Effectiveness of spraying with Tween 20 and lactic acid in decontaminating inoculated *E. coli* O151:H7 and indigenous *E. coli* biotype I on beef. *Journal of Food Protection* **65**:p. 26-32.

21. **Cappelier, J. M., E. Dromigny, M. Federighi, C. Magras, M. F. Pilet, and F. Tartrou.** 2006. Les dangers biologiques liés aux denrées alimentaires, Polycopié d'enseignement ENVN, UV 63, vol. 3.
22. **Cartier, P.** 2004. Points de repères en matière de qualité microbiologique viandes bovines. Viandes et Produits Carnés **Journées des sciences du muscle et technologies des viandes No10, Rennes , FRANCE (25/10/2004):**175-179.
23. **Castillo, A., L. M. Lucia, K. J. Goodson, J. W. Savell, and G. R. Acuff.** 1998. Comparison of water wash, trimming, and combined hot water and lactic acid treatments for reducing bacteria of fecal origin on beef carcasses. *Journal of Food Protection* **61**:p 823 - 828.
24. **Castillo, A., L. M. Lucia, G. K. Kemp, and G. R. Acuff.** 1999. Reduction of *Escherichia coli* 0157:H7 and *Salmonella typhimurium* on beef carcass surfaces using acidified sodium chlorite. *Journal of Food Protection* **62**:p. 580-584.
25. **Castillo, A., I. Mercado, J. W. Savell, and G. R. Acuff.** 2001. In-plant evaluation of a lactic acid treatments for reduction of bacteria on chilled beef carcasses. *Journal of Food Protection* **64**:738-740.
26. **Catsaras, M.** 1973. Les "intoxications" alimentaires par la viande et les produits carnés. *Industries alimentaires agricoles* **90**:1467-1473.
27. **Cavalli, S.** 2003. Application de la méthode HACCP en établissement d'abattage : modèles théoriques et essais de mise en place. *Médecine Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Lyon.*
28. **Centre National de Coordination des Etudes et des Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation, C. N. E. R. N. A.** 1982. *Hygiène et Technologie de la viande fraîche.*
29. **Chantarapanont, W., M. Berrang, and J. F. Frank.** 2003. Direct microscopic observation and viability determination of *Campylobacter jejuni* on chicken skin. *Journal of Food Protection* **66**:2222-2230.
30. **Chevrel, J. P.** 1994. *Anatomie Clinique: Tome 2: Le Tronc.*
31. **Clark, C. G., L. Price, R. Ahmed, D. L. Woodward, P. L. Melito, F. G. Rodgers, F. Jamieson, B. Ciebin, A. Li, and A. Ellis.** 2003. Characterization of Waterborne Outbreak-associated *Campylobacter jejuni*, Walkerton, Ontario. *Emerging Infectious Diseases* **9**.
32. **Cleaveland, S., M. Laurenson, and L. Taylor.** 2001. Diseases of humans and their domestic mammals : pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Phil.Trans.R. Soc.Lond.* **356**:p 991-999.
33. **Codex Alimentarius.** 1999. Code d'usages international recommandé - Principes généraux d'hygiène alimentaire. CAC/RCP 1-1969 et appendice.
34. **Cools, I., M. Uyttendaele, C. Caro, E. D'Haese, H. J. Nelis, and J. Debevere.** 2003. Survival of *Campylobacter jejuni* strains of different origin in drinking water. *Journal of Applied Microbiology* **94**:886-892.
35. **Cools, I., M. Uyttendaele, J. Cerpentier, E. D'Haese, H. J. Nelis, and J. Debevere.** 2005. Persistence of *Campylobacter jejuni* on surfaces in a processing environment and on cutting boards. *Letters in Applied Microbiology* **40**:418-423.
36. **Davis, M. A., and D. E. Conner.** 2007. Survival of *Campylobacter jejuni* on poultry skin and meat at varying temperatures. *Poultry Science* **86**:765-767.
37. **Dekeyser, P., M. Gossuin-Detrain, J. P. Butzler, and J. Sternon.** 1972. Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. *Journal of Infectious Diseases* **125**:390-392.
38. **del Río, E., M. Panizo-Morán, M. Prieto, C. Alonso-Calleja, and R. Capita.** 2007. Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. *International Journal of Food Microbiology* **115**:268-280.
39. **Dickson, J. S., and M. Anderson.** 1991. Microbiological decontamination of food animal carcasses by washing and sanitizing systems: a review. *Journal of Food Protection* **55**:133-140.
40. **Didier, R., and P. Rode.** 1935. *Archives d'Histoire Naturelle, volume X, Les mammifères de France.*

41. **Dorsa, W. J., C. N. Cutter, G. R. Siragusa, and M. Koohmaraie.** 1996. Microbial decontamination of beef and sheep carcasses by steam, hot water spray washes, and a steam-vacuum sanitizer. *Journal of Food Protection* **59**.
42. **Dumont, B. L., and C. Valin.** 1982. Bases biochimiques de l'hétérogénéité du tissu musculaire et des viandes (rappel sur la composition et la structure de la viande), p. 78-81. *In* CNERNA (ed.), *Hygiène et technologie de la viande fraîche*. Editions du CNRS.
43. **EFSA.** 2009. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. *The EFSA Journal*:223 p.
44. **EFSA.** 2005. Opinion of the Scientific Panel BIOHAZ on "Evaluation of the efficacy of peroxyacids for use as an antimicrobial substance applied on poultry carcasses."
45. **EFSA.** 2005. Opinion of the Scientific Panel on Food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to: Treatment of poultry carcasses with chlorine dioxide, acidified sodium chlorite, trisodium phosphate and peroxyacids.
46. **Elmossalami, E., and N. Wassef.** 1971. Penetration of Some Microorganisms in Meat. *Zentralblatt fuer Veterinaermedizin Reihe B* **18**:329-336 (résumé).
47. **Ericsson, C. D.** 2003. Travellers' diarrhoea. *International Journal of Antimicrobial Agents* **21**:116-124.
48. **Espié, E., E. Rouaul, A. Gallay, P. Lehours, and F. Mégraud.** 2006. Bilan de la surveillance des infections à *Campylobacter* en France en 2006.
49. **Euzéby, J. P.** 2007. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. <http://www.bacdico.net>.
50. **Federighi, M., C. Magras, and M. F. Pilet.** 1998. *Campylobacter*, p. p. 185-211, *Manuel de bactériologie alimentaire*. Polytechnica.
51. **Fosse, J.** 2008. Valeur informative d'indicateurs *ante* et *post mortem* pour la détection des dangers biologiques pour le consommateur de viande porcine. Université de Rennes 1.
52. **Fosse, J., M. Laroche, M. Federighi, and C. Magras.** 2006. Influence de la méthode de récupération, de la matrice carnée et de la souche sur le rendement de récupération de *Campylobacter* spp. implantés sur viande de porc. viandes et produits carnés **HS 11 JSMTV**:177-178 affiche <http://www.office-elevage.fr/vpc/11jsmtv/11JSMTV-H-POS6.pdf>.
53. **Fosse, J., M. Laroche, N. Oudot, A. Rossero, and C. Magras.** 2008. Quantification de la détection de dangers bactériens contaminant des carcasses de porcs à l'aide d'indicateurs macroscopiques. *Viandes et Produits Carnés* **NS**:227-228.
54. **Fosse, J., M. Laroche, A. Rossero, M. Federighi, H. Seegers, and C. Magras.** 2006. Recovery methods for detection and quantification of *Campylobacter* depend on meat matrices and bacteriological or PCR tools. *Journal of Food Protection* **69**:2100-2106.
55. **Fosse, J., N. Oudot, M. Laroche, A. Rossero, H. Seegers, and C. Magras.** 2008. Contamination de lots de porcs par cinq agents de zoonoses alimentaires bactériennes : Variabilité en élevage et à l'abattoir. *Epidémiologie et santé animale* **53**:sous presse.
56. **Fosse, J., N. Oudot, A. Rossero, M. Laroche, M. Federighi, H. Seegers, and C. Magras.** 2008. Contamination de produits primaires porcins par *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens* et *Salmonella enterica*. *Journées Recherche Porcine* **40**:55-60 <http://www.journees-recherche-porcine.com/texte/index.htm>.
57. **Fosse, J., H. Seegers, and C. Magras.** 2008. Foodborne zoonoses due to meat: a quantitative approach for a comparative risk assessment applied to pig slaughtering in Europe. *Veterinary Research* **39**.
58. **Fosse, J., H. Seegers, and C. Magras.** 2008. Hiérarchiser les risques de zoonoses alimentaires : une approche quantitative. Application aux dangers bactériens transmis par les viandes porcine et bovine. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* **27**:643 - 655.

59. **Foucart, S., and P. Ricard.** 2008. Le retour des « poulets chlorés » suscite de nombreuses protestations, Le Monde, Paris.
60. **Fournaud, J., T. Degas, O. Schmitt, and J. Sechet.** 1980. Penetration of bacteria into meat. Proceedings of the European Meeting of Meat Research Workers:268-271.
61. **Gallay, A., E. Espié, V. Prouzet-Mauléon, É. Rouault, P. Lehours, and F. Mégraud.** 2007. Surveillance des infections à *Campylobacter* en France : bilan de la surveillance du réseau de laboratoires de ville et hospitaliers, 2004-2005. Institut de veille sanitaire:<http://www.invs.sante.fr>.
62. **Giannuzzi, L., A. Pinotti, and N. Zaritzky.** 1998. Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. International Journal of Food Microbiology **39**:101-110.
63. **Gilbert, C. D., and M. F. Slavik.** 2005. Evaluation of attachment and penetration abilities of *Campylobacter jejuni* isolates obtained from humans and chicken carcasses during processing and at retail. Journal of Food Safety **25**:209-223.
64. **Gill, C.** 1979. A Review Intrinsic Bacteria in Meat. Journal of Applied Bacteriology **47**:367-378.
65. **Gill, C. O., D. S. McGinnis, J. Bryant, and B. Chabot.** 1995. Decontamination of commercial, polished pig carcasses with hot water. Food Microbiology **12**:143-149.
66. **Gill, C. O., and N. Penney.** 1982. Bacterial Penetration of Muscle-Tissue. Journal of Food Science **47**:690-691.
67. **Gill, C. O., and N. Penney.** 1977. Penetration of Bacteria into Meat. Applied and Environmental Microbiology **33**:1284-1286.
68. **Gill, C. O., N. Penney, and P. M. Nottingham.** 1978. Tissue Sterility in Un-Eviscerated Carcasses. Applied and Environmental Microbiology **36**:356-359.
69. **Gill, G. O., and L. M. Harris.** 1982. Survival and growth of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on meat and in cooked foods. Applied and Environmental Microbiology **44**:259-263.
70. **Goksoy, E. O., C. James, J. E. L. Corry, and S. J. James.** 2001. The effect of hot-water immersions on the appearance and microbiological quality of skin-on chicken-breast pieces. International Journal of Food Science & Technology **36**:61-69.
71. **Gorman, B. M., J. N. Sofos, J. B. Morgan, G. R. Schmidt, and G. C. Smith.** 1995. Evaluation of hand trimming, various sanitizing agents, and hot spray washing as decontamination intervention for beef brisket adipose tissue. Journal of Food Protection **58**:p. 899-907.
72. **Grau, F. H.** 1983. Growth of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* on beef tissue at 25°C. Journal of Food Science **48**:1700-1704.
73. **Graves, T. K., K. K. Bradley, and J. M. Crutcher.** 1998. Outbreak of *Campylobacter* enteritis associated with cross-contamination of food - Oklahoma, 1996 (Reprinted from MMWR, vol 47, pg 129-131, 1998). Jama-Journal of the American Medical Association **279**:1341-1341.
74. **Greig, J. D., and A. Ravel.** 2009. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. International Journal of Food Microbiology **130**:77-87.
75. **Griffiths, P. L., and R. W. A. Park.** 1990. *Campylobacter*s associated with human diarrhoeal disease. Journal of Applied Bacteriology **69**:281-301.
76. **Huffman, R. D.** 2002. Current and future technologies for the decontamination of carcasses and fresh meat. Meat Science **62**:285-294.
77. **Huneau-Salaun, A., M. Denis, L. Balaine, and G. Salvat.** 2007. Risk factors for *Campylobacter* spp. colonization in French free-range broiler-chicken flocks at the end of the indoor rearing period. Preventive Veterinary Medicine **80**:34-48.
78. **Institut Technique de l'AViculture, I.** 2008. Guides des bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes d'HACCP pour les petites structures d'abattage et de découpe de volailles maigres et de lagomorphes.

79. **James, C., E. O. Goksoy, J. E. L. Corry, and S. J. James.** 2000. Surface pasteurisation of poultry meat using steam at atmospheric pressure. *Journal of Food Engineering* **45**:111-117.
80. **James, C., J. A. Thornton, L. Ketteringham, and S. J. James.** 2000. Effect of steam condensation, hot water or chlorinated hot water immersion on bacterial numbers and quality of lamb carcasses. *Journal of Food Engineering* **43**:219-225.
81. **Jimenez, M., P. Soler, J. D. Venanzi, P. Cante, C. Varela, and N. F. Martinez.** 2005. An outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis in a school of Madrid, Spain. *Euro Surveill* **10**:118-121.
82. **Jouve, J. L.** 1995. La qualité microbiologique des aliments - Maîtrise et critères. Polytechnica.
83. **Jung, S., M. Ghouli, and M. de Lamballerie-Anton.** 2003. Influence of high pressure on the color and microbial quality of beef meat. *Lebensmittel Wissenschaft and Technology* **36**:625-631.
84. **Kaiser, J.** 2004. Survie de *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli* en milieu modèle et sur matrices carnées porcines. *Médecine Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Nantes.*
85. **Karenlampi, R., and M. L. Hanninen.** 2004. Survival of *Campylobacter jejuni* on various fresh produce. *International Journal of Food Microbiology* **97**:187-195.
86. **Karlyshev, A. V., P. Everest, D. Linton, S. Cawthraw, D. G. Newell, and B. W. Wren.** 2004. The *Campylobacter jejuni* general glycosylation system is important for attachment to human epithelial cells and in the colonization of chicks. *Microbiology-Sgm* **150**:1957-1964.
87. **Kelly, C. A., and J. F. Dempster.** 1981. The effect of temperature, pressure and chlorine concentration of spray washing water on numbers of bacteria on lamb carcasses. *Journal of Applied Microbiology* **51**:p. 415-424.
88. **King, L., P. Lehours, and F. Mégraud.** 2007. Bilan de la surveillance des infections à *Campylobacter* chez l'Homme en France en 2007. Centre National de Référence des *Campylobacters* et des *Helicobacters*.
89. **Kist, M.** 1985. Presented at the Proceedings of the third international workshop on *Campylobacter*, Ottawa, 7-10 July 1985, 1985.
90. **Kochevar, S. L., J. N. Sofos, R. Robert, J. O. Reagan, and G. C. Smith.** 1997. Steam vacuuming as a pre-evisceration intervention to decontaminate beef carcasses. *Journal of Food Protection* **60**.
91. **Koohmaraie, M., T. M. Arthur, J. M. Bosilevac, M. Guerini, S. D. Shackelford, and T. L. Wheeler.** 2005. Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. *Meat Science* **71**:79-91.
92. **Kotula, A. W., W. R. Lusby, and J. D. Crouse.** 1974. Beef carcass washing to reduce bacterial contamination. *Journal of Animal Science* **39**:674-679.
93. **Kozempel, M., N. Goldberg, E. R. Radewonuk, and O. J. Scullen.** 2000. Commercial testing and optimization studies of the surface pasteurization process of chicken. *Journal of Food Process Engineering* **23**:387-402.
94. **Kusumaningrum, H. D., G. Riboldi, W. C. Hazeleger, and R. R. Beumer.** 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology* **85**:227-236.
95. **Lahr, J. A.** 1996. Presented at the 49th Annual Reciprocal Meats Conference, Utah.
96. **Laroche, M., J. Kaiser, M. Federighi, and C. Magras.** 2004. Survie de *Campylobacter jejuni* et de *Campylobacter coli* sur des échantillons de couenne et de viande de porc stockés à 4°C. Viandes et produits carnés:185-186 10èmes Journées « Sciences du Muscle et Technologies des Viandes » <http://www.ofival.fr/vpc/10jsmtv/com-05-02.pdf>.
97. **Laroche, M., and J. Marcel.** 1995. Influence des conditions d'abattage sur la qualité de la chair de carpe : 1 - Conséquences de la saignée et de la méthode d'anesthésie. *Pisciculture-Francaise* **121**:8-12.
98. **Laroche, M., B. Minvielle, M. Lebigre, M. H. Desmots, C. Mircovich, and C. Magras.** 2006. Statut de dangerosité des carcasses de porcs vis-à-vis du danger

- Campylobacter spp. Viandes et produits carnés **HS 11 JSMTV**:163-164  
<http://www.office-elevage.fr/vpc/11jsmtv/11JSMTV-H-COM4.pdf>.
99. **Lebert, I., V. Robles-Olvera, and A. Lebert.** 2000. Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* in meat. *International Journal of Food Microbiology* **61**:27-39.
  100. **Lebigre, M.** 2004. Prévalence et niveau de contamination en *Campylobacter* thermotolérants des porcs et de leur carcasse à l'abattoir. *Médecine Vétérinaire*, Nantes.
  101. **Lee, A., S. C. Smith, and P. J. Coloe.** 1998. Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions. *Journal of Food Protection* **61**:1609-1614.
  102. **Li, Q., and C. M. Logue.** 2005. The growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on minced bison and pieces of bison meat stored at 5 and 10 °C. *Food Microbiology* **22**:415-421.
  103. **Lior, H., D. L. Woodward, J. A. Edgar, L. J. Laroche, and P. Gill.** 1982. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *Journal of Clinical Microbiology* **155**:761-768.
  104. **Logue, C. M., J. J. Sheridan, D. A. McDowell, I. S. Blair, and D. Harrington.** 1998. A study of the growth of plasmid bearing and plasmid cured strains of antibiotic resistant *Yersinia enterocolitica* serotype 0:3 on refrigerated beef, pork and lamb. *Food Microbiology* **15**:603-615.
  105. **MacFayden, F., and S. Stockman.** 1913. Final report of the departemental comittee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion: abortion in sheep. His Majesty's Stationery Office.
  106. **Madden, R. H., K. A. Murray, and A. Gilmour.** 2007. Carriage of four bacterial pathogens by beef cattle in Northern Ireland at time of slaughter. *Letters in Applied Microbiology* **44**:115-119.
  107. **Marshall, K., R. Stout, and R. Mitchell.** 1971. Mechanisms of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Journal of General Microbiology* **68**.
  108. **Mattick, K., K. Durham, G. Domingue, F. Jorgensen, M. Sen, D. W. Schaffner, and T. Humphrey.** 2003. The survival of foodborne pathogens during domestic washing-up and subsequent transfer onto washing-up sponges, kitchen surfaces and food. *International Journal of Food Microbiology* **85**:213-226.
  109. **Mazick, A., S. Ethelberg, N. Moller, K. Molbak, and M. Lisby.** 2006. An outbreak of *Campylobacter jejuni* associated with consumption of chicken, Copenhagen, 2005. *Eurosurveillance* **11**.
  110. **Megraud, F.** 1986. Les infections des *Campylobacter*. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* **14**:53.
  111. **Merle, E.** 2005. Application de la méthode HACCP en abattoir : bilan de deux années de mise en oeuvre. *Médecine vétérinaire*. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse.
  112. **Midelet, G., and B. Carpentier.** 2002. Transfer of Microorganisms, Including *Listeria monocytogenes*, from Various Materials to Beef. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:4015-4024.
  113. **Minihan, D., P. Whyte, M. O'Mahony, S. Fanning, K. McGill, and J. D. Collins.** 2004. *Campylobacter* spp. in Irish feedlot cattle: A longitudinal study involving pre-harvest and harvest phases of the food chain. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health* **51**:28-33.
  114. **Minvielle, B., A. Le Roux, and S. De Montzey.** 2005. Décontamination des carcasses de porc. Double flambage : intérêt et efficacité du procédé. *Viandes et Produits Carnés* **24**:83-87.
  115. **Miserey, Y.** 2008. Poulets chlorés : un risque professionnel avant tout, *Le Figaro*, Paris.
  116. **Moore, J. E., and R. H. Madden.** 2001. Survival of *Campylobacter coli* in porcine liver. *Food Microbiology* **18**:1-10.

117. **Morgan, A. I., N. Goldberg, E. R. Radewonuk, and O. J. Scullen.** 1996. Surface Pasteurization of Raw Poultry Meat by Steam. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **29**:447-451.
118. **Munroe, D. L., J. F. Prescott, and J. L. Penner.** 1983. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Serotypes isolated from Chickens, Cattle, and Pigs. *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 18**:877-881.
119. **Musgrove, M. T., M. E. Berrang, J. A. Byrd, N. J. Stern, and N. A. Cox.** 2001. Detection of *Campylobacter* spp. in ceca and crops with and without enrichment. *Poultry Science* **80**:825-828.
120. **Nachamkin I., B. M. J.** 2000. *Campylobacter*, 2 ed. ASM press.
121. **Naidu, A. S.** 2002. Activated Lactoferrin -- A New Approach to Meat Safety. *Journal of Food Technology* **62**:p 40-45.
122. **Nielsen, E. M.** 2002. Occurrence and strain diversity of thermophilic campylobacters in cattle of different age groups in dairy herds. *Letters in Applied Microbiology* **35**:85-89.
123. **Nissen, H., T. Maugesten, and P. Lea.** 2001. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella enteritidis* on decontaminated and untreated meat. *Meat Science* **57**:291-298.
124. **Nutsch, A. L., R. K. Phebus, M. J. Riemann, J. S. Kotrola, R. C. Wilson, J. E. J. Boyer, and T. L. Brown.** 1998. Steam pasteurization of commercially slaughtered beef carcasses : evaluation of bacterial populations at five anatomical locations. *Journal of Food Protection* **61**:p 571 - 577.
125. **Olsen, S. J., G. R. Hansen, L. Bartlett, C. Fitzgerald, A. Sonder, R. Manjrekar, T. Riggs, J. Kim, R. Flahart, G. Pezzino, and D. L. Swerdlow.** 2001. An outbreak of *Campylobacter jejuni* infections associated with food handler contamination: The use of pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Infectious Diseases* **183**:164-167.
126. **Palumbo, S. A., A. R. Pickard, and J. E. Call.** 1997. Population Changes and Verotoxin Production of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains Inoculated in Milk and Ground Beef Held at Low Temperatures:. *Journal of Food Protection* **60**:746-750.
127. **Pearce, R. A., F. M. Wallace, J. E. Call, R. L. Dudley, A. Oser, L. Yoder, J. J. Sheridan, and J. B. Luchansky.** 2003. Prevalence of *Campylobacter* within a swine slaughter and processing facility. *Journal of Food Protection* **66**:1550-1556.
128. **Penner, J. L., and J. N. Hennessy.** 1980. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *Journal of Clinical Microbiology* **12**:732-737.
129. **Pezzotti, G., A. Serafin, I. Luzzi, R. Mioni, M. Milan, and R. Perin.** 2003. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. *International Journal of Food Microbiology* **82**:281-287.
130. **Pipek, P., M. Houska, K. Hoke, J. Jeleníková, K. Kýhos, and M. Sikulová.** 2006. Decontamination of pork carcasses by steam and lactic acid. *Journal of Food Engineering* **74**:224-231.
131. **Pipek, P., M. Houska, J. Jeleníková, K. Kýhos, K. Hoke, and M. Sikulová.** 2005. Microbial decontamination of beef carcasses by combination of steaming and lactic acid spray. *Journal of Food Engineering* **67**:309-315.
132. **Prescott, J. F., and O. S. Gellner.** 1984. Intestinal carriage of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* by chicken flocks at slaughter. *Canadian Journal of Comp. Medicine* **48**:329-331.
133. **Raupach, J. C. A., and R. L. Hundy.** 2003. An outbreak of *Campylobacter jejuni* infection among conference delegates. *Communicable diseases intelligence* **27**.
134. **Reich, F., V. Atanassova, E. Haunhorst, and G. Klein.** 2008. The effects of *Campylobacter* numbers in caeca on the contamination of broiler carcasses with *Campylobacter*. *International Journal of Food Microbiology* **127**:116-20.
135. **Romans, J. R., W. J. Costello, C. W. Carlson, M. L. Greaser, and K. W. Jones.** 1994. *The meat we eat* (13e edition), Danville.

136. **Rosenfield, J. A., G. J. Arnold, G. R. Davey, R. S. Archer, and W. H. Woods.** 1985. Serotyping of *Campylobacter jejuni* from an outbreak of enteritis implicating chicken. *Journal of Infection* **11**:159-165.
137. **Rosset, R., and P. Liger.** 1982. Nature des porteurs de germes., p. p. 105-108. In C.N.E.R.N.A. (ed.), *Hygiène et technologie de la viande fraîche*. Editions du CNRS.
138. **Salvat, G., M. Chemaly, M. Denis, R. C., A. Huneau, S. Le Bouquin, V. Michel, and P. Fravalo.** 2008. Evolution des risques sanitaires : *Campylobacter* et *Salmonelles*. *Viande et produits carnés HS*:197 - 202 12èmes JSMTV <http://www.office-elevage.fr/vpc/12jsmtv/articles/14-CI-HS-01.pdf>.
139. **Samelis, J., J. N. Sofos, P. A. Kendall, and G. C. Smith.** 2002. Effect of acid adaptation on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in meat decontamination washing fluids and potential effects of organic acid interventions on the microbial ecology of the meat plant environment. *Journal of Food Protection* **65**:p. 33-40.
140. **Sanders, D., U. P. Hansen, and L. S. Clifford.** 1981. Role of the plasma proton pump in pH regulation in non-animal cells. *Proceedings of National Academy of Science* **78**:p. 5903-5907.
141. **Sebald, M., and M. Veron.** 1963. Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. *Annales de l'Institut Pasteur* **105**:897.
142. **Skirrow, M. B., and J. Benjamin.** 1982. The classification of "thermophilic" *Campylobacters* and their distribution in man and domestics animals, p. 40-44, *Campylobacter : Epidemiology. Pathogenesis and Biochemistry* MTP Press, Lancaster,.
143. **Smith, T., and M. S. Taylor.** 1919. Some Morphological and Biological Characters Of The Spirilla (*Vibrio fetus*, n.sp.) Associated With the Disease Of Fetal Membrane In Cattle. *The Journal of Experimental Medicine* **30**:299-311.
144. **Snidjers, J. M., J. G. van Logtestijn, D. A. Mossel, and F. J. Smulders.** 1985. Lactic acid as a decontaminant in slaughter and processing procedures. *The Veterinary Quarterly* **7**:p. 277-282.
145. **Solow, B. T., O. M. Cloak, and P. M. Fratamico.** 2003. Effect of temperature on viability of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on raw chicken or pork skin. *Journal of Food Protection* **66**:2023-2031.
146. **Stern, N. J., F. Georgsson, R. Lowman, J. R. Bisailon, J. Reiersen, K. A. Callicott, M. Geirsdottir, R. Hrolfsdottir, and K. L. Hielt.** 2007. Frequency and enumeration of *Campylobacter* species from processed broiler carcasses by weep and rinse samples. *Poultry Science* **86**:394-399.
147. **Stern, N. J., and A. W. Kotula.** 1982. Survival of *Campylobacter jejuni* inoculated into ground beef. *Applied and Environmental Microbiology* **44**:1150-1153.
148. **Straw, B. E.** 1990. Effect of *Campylobacter* spp. induced enteritis on growth rate and feed efficiency in pigs. *Journal of American Veterinary Medical Association* **197**:p. 355-357.
149. **Sulaeman, S., G. Le Bihan, A. Rossero, M. Federighi, E. Dé, and O. Tresse.** 2009. Comparison between the biofilm initiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains to an inert surface using BioFilm Ring Test®. *Journal of Applied Microbiology* **sous presse**.
150. **Sutra, L., M. Federighi, and J. L. Jouve.** 1998. *Manuel de microbiologie alimentaire*. Polytechnica.
151. **Tamplin, M. L.** 2002. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef stored at 10°C and the influence of competitive bacterial flora, strain variation, and fat level. *Journal of Food Protection* **65**:1535 -1540.
152. **Thomas, M.** 1966. Bacterial penetration in raw meats: comparisons using a new technique. *Mon Bull Minist Health Public Health Lab Serv* **25**:42-52.
153. **Unité d'Histologie-Anatomie Pathologique.** 2006. *Histologie animale : Tome I : Les tissus: épithéliaux, conjonctifs, musculaires et nerveux*. Polycopié d'enseignement, UV 55.

154. **USDA-FSIS.** 1996. Noticy for policy change : achieving the zero tolerance performance standard for beef carcasses by knife trimming and vacuuming with hot water or steam; use of acceptable carcass interventions for reducing carcasse contamination without priori agency approval. Federal Register **61**:p. 15024-15027.
155. **Vaillant, V., H. De Valk, and E. Baron.** 2004. Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France. Institut de Veille Sanitaire (I.N.V.S.) Saint Maurice, Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments (A.F.S.S.A), Maison Alfort.
156. **Valin, C., J. Fournaud, A. Lacourt, and C. Touraille.** 1976. Evolution, en cours de conservation, des caractéristiques de tendreté de muscles de bovins mis sous vide ante rigor mortis. Annales de Technologie Agricole **25**:357-372.
157. **Van de Giessen, A. W., J. J. Tilburg, W. S. Ritmeester, and J. van der Plas.** 1998. Reduction of *Campylobacter* infections in broiler flocks by application of hygiene measures. Epidemiol Infect **121**:57-66.
158. **Vandamme, P., and J. De Ley.** 1991. Proposal for a new family : Campylobacteraceae. International Journal of Systematic Microbiology **41**:451-455.
159. **Vandamme, P., E. Falsen, R. Rossau, B. Hoste, P. Segers, R. Tytgat, and J. De Ley.** 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy : emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen.nov. International Journal of Systematic Bacteriology **41**:88-103.
160. **Veron, M.** 1982. *Campylobacter*. In : Bactériologie Médicale **Le Minor et Véron**:430-474.
161. **Veron, M.** 1989. *Campylobacter* : une bactérie moderne ? Médecine et Maladies Infectieuses **19**:6-11.
162. **Veron, M., and R. Chatelain.** 1973. Taxonomic study of genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* ( Smith and Taylor ) Sebald and Veron. International Journal of Systematic Bacteriology **23**:122-134.
163. **Vold, L., A. Holck, Y. Wasteson, and H. Nissen.** 2000. High levels of background flora inhibits growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. International Journal of Food Microbiology **56**:219-225.
164. **Warriner, K., K. Eveleigh, J. Goodman, G. Betts, M. Gonzales, and W. M. Waites.** 2001. Attachment of bacteria to beff from steam-pasteurized carcasses. Journal of Food Protection **64**:p. 493-497.
165. **Wei, Q. K., T. J. Fang, and W. C. Chen.** 2000. Development and validation of growth model for *Yersinia enterocolitica* in cooked chicken meats packaged under various atmosphere packaging and stored at different temperatures. Journal of Food Protection **64**:987-993.
166. **Whyte, P., K. McGill, and J. D. Collins.** 2003. An assessment of steam pasteurization and hot water immersion treatments for the microbiological decontamination of broiler carcasses. Food Microbiology **20**:111-117.
167. **Yoon, K. S., C. N. Burnette, and T. P. Oscar.** 2004. Development of predictive models for the survival of *Campylobacter jejuni* (ATCC 43051) on cooked chicken breast patties and in broth as a function of temperature. Journal of Food Protection **67**:64-70.
168. **Young, C. R., R. Harvey, R. Anderson, D. Nisbet, and L. H. Stanker.** 2000. Enteric colonisation following natural exposure to *Campylobacter* in pigs. Research in Veterinary Science **68**:75-78.
169. **Zanoni, R. G., L. Debruyne, M. Rossi, J. Revez, and P. Vandamme.** 2009. *Campylobacter cuniculorum* sp nov., from rabbits. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **59**:1666-1671.

# Annexes

## Annexe B : BPH, HACCP et critères microbiologiques.

### B1 Causes générales de contamination et BPH associées (82, 111).

Origine	Causes	Mesures préventives
<b>Matériel</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Matériel souillé : couteaux, fusils, tabliers de protection...</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mise en place du plan de nettoyage et désinfection</li> <li>- Nettoyage régulier du matériel pendant la production</li> <li>- Nettoyage et désinfection des couteaux entre chaque carcasse</li> <li>- Affûter le couteau avant d'utiliser le stérilisateur</li> <li>- Laisser les couteaux inutilisés dans le stérilisateur</li> <li>- Stérilisateurs à outils contenant une eau à température minimale de 82°C</li> <li>- Nettoyage fréquent des tabliers et des gants métalliques</li> </ul>
<b>Matières premières</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contact des carcasses entre elles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Conserver un espace suffisant entre les carcasses dans la chaîne d'abattage</li> </ul>
<b>Milieu</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Circulation du secteur souillé vers le secteur propre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Séparation rigoureuse des secteurs propres et des secteurs souillés</li> <li>- Marche en avant des carcasses et des cinquièmes quartiers sur la chaîne</li> <li>- Gestion des déplacements du personnel uniquement du propre vers le sale</li> <li>- Favoriser la fixité des postes, notamment personnel d'abattage en nombre suffisant</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Surfaces sales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Taille des locaux adaptée au tonnage réalisé</li> <li>- Dispositif et plan de nettoyage désinfection</li> <li>- Sols, murs, plafonds facilement lavables (lisses, absence d'angles...)</li> <li>- Bon état d'entretien des locaux (absence de fissures, de trous...)</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Air pollué</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Renouveler l'air intérieur</li> <li>- Filtrer l'air extérieur</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilisation d'eau contaminée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Utiliser de l'eau potable</li> <li>- Contrôle microbiologique de l'eau</li> <li>- Pas de nettoyage en cours d'abattage</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contact entre les carcasses et les déchets (fèces, morceau de viande ou de gras, contenu des viscères...)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elimination rapide des déchets par mise à disposition des moyens adéquats</li> <li>- Les circuits de déchets ne croisent pas celui des carcasses et des abats</li> <li>- Bacs à déchets en parfait état d'entretien et de propreté</li> </ul>
<b>Méthode</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mauvaise manipulation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Formation du personnel aux techniques</li> <li>- Ergonomie des postes</li> </ul>
<b>Main d'œuvre</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mauvaise hygiène du personnel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Formation à l'hygiène du personnel</li> <li>- Mise à disposition de vêtements, de matériel et de locaux adaptés et propres</li> <li>- Changement journalier de tenue</li> <li>- Nettoyage et désinfection des mains réguliers et après toute contamination</li> <li>- Contrôle de la santé du personnel</li> </ul>

## B2 : BPH liées au risque de contamination d'origine cutanée.

### Préparation des carcasses à l'arrachage du cuir

Origine	Causes	Mesures préventives
<b>Matériel</b> <b>Méthodes</b> <b>Main d'œuvre</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contacts directs entre le cuir et la viande par l'intermédiaire de la lame du couteau ou des mains du personnel</li> <li>- Mamelle percée avec écoulement de lait sur la carcasse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disposer de plusieurs couteaux</li> <li>- Réserver un couteau pour tracer le cuir</li> <li>- Utiliser un autre couteau ou une pince pour séparer les pattes et la tête</li> <li>- Dépouiller de telle manière que le cuir n'entre pas en contact avec le muscle</li> <li>- Parfilage de haut en bas, en un seul tracé</li> <li>- Précaution gestuelle afin de ne pas entamer les muscles</li> <li>- Toujours la même main pour tenir le cuir : spécialisation des mains</li> <li>- Lavage des mains entre chaque carcasse</li> <li>- Nettoyage et désinfection des outils entre chaque carcasse</li> <li>- Ne pas percer les mamelles</li> <li>- Tracer le cuir autour des trayons sans découper les mamelles</li> </ul>
<b>Matière première</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Présence d'une arthrite</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Eviter de couper l'articulation atteinte</li> <li>- Avertir le service d'inspection vétérinaire</li> </ul>

### Arrachage du cuir

Origine	Causes	Mesures Préventives
<b>Milieu</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contact entre les carcasses dépouillées et non dépouillées</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Distance suffisante entre deux carcasses le long de la chaîne d'abattage</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contacts de la carcasse avec le cuir, la mamelle, les cornes et les onglons</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ceux-ci sont immédiatement évacués vers les salles prévues à cet effet (séparation secteur propre/ secteur souillé)</li> </ul>
<b>Méthode</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Retombées de particules lors de l'arrachage du cuir</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pratiquer l'arrachage du cuir sans secousse du haut vers le bas</li> </ul>
<b>Main d'œuvre</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contact avec les mains du personnel souillées par le cuir</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Spécialisation des mains</li> <li>- Lavage des mains entre chaque carcasse</li> </ul>

### B3 : Les sept principes fondateurs de l'HACCP.

- Principe 1 : Procéder à l'analyse des dangers : identifier les dangers associés à la production alimentaire concernée, évaluer la probabilité d'apparition et identifier les mesures de maîtrise nécessaires
- Principe 2 : Déterminer les points critiques pour la maîtrise de ces dangers ou CCP (Critical Control Points)
- Principe 3 : Etablir les limites critiques dont le respect atteste de la maîtrise effective des CCP
- Principe 4 : Etablir un système de surveillance permettant de s'assurer de la maîtrise effective des CCP
- Principe 5 : Etablir les actions correctives à mettre en œuvre lorsque la surveillance révèle qu'un CCP donné n'est plus maîtrisé
- Principe 6 : Etablir des procédures spécifiques pour la vérification du bon fonctionnement du système HACCP
- Principe 7 : Etablir un système documentaire approprié couvrant l'application des six principes précédents et les enregistrements des systèmes de surveillance

B4 : Critères microbiologiques pour les carcasses  
 (chapitre 2, règlement 2073/2005)

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes	Plan d'échantillonnage (1)		Limites (2)		Méthode d'analyse de référence (3)	Stade d'application du critère	Action en cas de résultats insatisfaisants
		n	c	m	M			
2.1.1 Carcasses de bovins, d'ovins, de caprins et d'équidés (4)	Nombre de colonies aérobies			3,5 log ufc/cm <sup>2</sup> log moyen quotidien	5,0 log ufc/cm <sup>2</sup> log moyen quotidien	ISO 4833	Carcasses après l'abattage, mais avant le ressuage	Améliorations de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédé
	Enterobacteriaceae			1,5 log ufc/cm <sup>2</sup> log moyen quotidien	2,5 log ufc/cm <sup>2</sup> log moyen quotidien	ISO 21528-2	Carcasses après l'abattage, mais avant le ressuage	Améliorations de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédé
2.1.2 Carcasses de porcins (4)	Nombre de colonies aérobies			4,0 log ufc/cm <sup>2</sup> log moyen quotidien	5,0 log ufc/cm <sup>2</sup> log moyen quotidien	ISO 4833	Carcasses après l'abattage, mais avant le ressuage	Améliorations de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédé
	Enterobacteriaceae			2,0 log ufc/cm <sup>2</sup> log moyen quotidien	3,0 log ufc/cm <sup>2</sup> log moyen quotidien	ISO 21528-2	Carcasses après l'abattage, mais avant le ressuage	Améliorations de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédé
2.1.3 Carcasses de bovins, d'ovins, de caprins et d'équidés	<i>Salmonella</i>	50 (5)	2 (6)	Absence dans la partie examinée de la carcasse		EN/ISO 6579	Carcasses après l'abattage, mais avant le ressuage	Améliorations de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédé et de l'origine des animaux
2.1.4 Carcasses de porcins	<i>Salmonella</i>	50 (5)	5 (6)	Absence dans la partie examinée de la carcasse		EN/ISO 6579	Carcasses après l'abattage, mais avant le ressuage	Améliorations de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédé, de l'origine des animaux et des mesures de biosécurité dans les exploitations d'origine
2.1.5 Carcasses de volailles: poulets et dindes	<i>Salmonella</i>	50 (5)	7 (6)	Absence dans 25 g d'un échantillon groupé de peau du cou		EN/ISO 6579	Carcasses après le ressuage	Améliorations de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédé, de l'origine des animaux et des mesures de biosécurité dans les exploitations d'origine

B5: Tableaux de synthèse des techniques de décontamination des carcasses, des viandes et des produits carnés approuvés par l'USDA.

Procédés	Technologie	Application	Réduction microbienne	Avantages	Inconvénients	Approbation	Distributeur
Physiques	Rinse and Chill	10 - 15 s	0,2 - 2 Log	Amélioration de la qualité microbiologique des viandes	Investissement et coûts importants pour les industriels	USA, Japon, Corée	MPSC
	Hautes pressions	0,5 - 5 min	> 4 Log	Augmentation de la durée de vie des produits	Investissement et coûts importants pour les industriels	Pas de législation	Avure Technologies
	Eau chaude/pasteurisation	10-15 s à 75-85 °C	1-3 Log	Utilisable en combinaison avec procédés chimiques	Décoloration des viandes possibles	USA, Australie	FPE, APV, CHAD Company FMC
	Vapeur	Secondes	1 - 3 Log	Action dirigée en fonction de la contamination visible	Couteux, blanchissement de la surface des carcasses	Pas de restriction	Vac San-Kentmaster, Australia
	Eau électrolysée	Pulvérisation	1,5 à 3 Log sur surfaces inertes	Le sel est le seul produit chimique utilisé	Un certain capital est nécessaire, mais cette méthode peut être meilleur marché par rapport à d'autres	USA	Primacide – Electric Aquagenics Unlimited

Procédés	Technologie	Application	Réduction microbienne	Avantages	Inconvénients	Approbation	Distributeur	
Chimiques	Acides organiques	10-30 s fonction de la température	1 - 3 Log	Application par pulvérisation	Décoloration des viandes possible – acido-résistance des pathogènes – corrosion du matériel	USA	CHAD Company - Ecolab	
	Phosphate trisodium	10 s	0,7 - 1,5 Log		Contamination des effluents	USDA		
	Acide peroxyacétique	10 - 30 s	1,4 Log	Faibles concentrations	Décoloration possible	USDA	CHAD Company - Ecolab	
	Eau ozonée	15 - 60 s	1 - 2 Log	Ozone se dissipe rapidement	Décoloration possible	USDA	Ozone Safe Food – Pacific Ozone	
	Lactoferrine			0,7 à 2,5 Log	Produits naturels. Utilisables dans les emballages sous vide. Effet possible sur la DLC des produits	Si ajoutée aux abats : abats doivent être humidifiés avant emballage	USA, autorisée au Japon et Corée	National Beef Company
	Chlorure de sodium acide	> 60 s	> 4 Log	Non affecté par la charge organique. Effet continu sur le produit emballé	Dans le cas d'utilisation d'acides actifs, programmer la sécurité de stockage et des opérateurs	USDA	Vibrex – Grayson, Australie. Zydox – Zychem Technologies. Sanover – Alcid Corporation	
	Chlorure de Cetylpyridium	15 - 30 s à 1%	1,5 - 2 Log sur les cuirs. 2,1 Log sur les tissus de bœuf	Effet sur le cuir jusqu'à 4 heures, aucun impact sur la texture, le goût, l'apparence et l'odeur	Résidus jusqu'à 1% sur la viande	USDA	CHAD. Safe Foods Corp (Cecure)	



## Annexe C : *Campylobacter*

### C1 : A propos de *Campylobacter*

- **Taxonomie**

Le genre *Campylobacter* (du grec *Kampulos*=incurvé et *Bacter*=bâtonnet) appartient à une des super-familles de la classe des Protéobactéries (160), dont fait notamment partie le taxon *Helicobacter*. Il a été regroupé au sein d'une même famille avec le genre *Arcobacter* avec lequel il présente de fortes affinités phylogénétique. L'historique de leur découverte et la taxonomie des *Campylobacters* est présentée en annexe.

- **Historique**

Les premières traces écrites marquant la découverte de *Campylobacter* datent de 1886 et proviennent d'une publication allemande de Theodor Escherich (89 cité par, 120). Il décrit ce qui s'avéra être des *Campylobacter* typiques sur des échantillons de mucus du colon provenant d'enfants morts de ce que l'on appelait à l'époque le « cholera infantum ». Escherich tenta, en vain, de cultiver ces « vibrions » et il conclut finalement que leur présence ne devait pas être liée à l'atteinte digestive observée

D'autres descriptions de bactéries spiralées provenant du tube digestif parurent durant les années suivantes. Certaines de ces bactéries étaient probablement des *Campylobacter*, mais personne ne parvint à les cultiver, si bien que l'intérêt qui leur était porté diminua.

Les premiers travaux portant sur ces « vibrions » furent menés par des vétérinaires, avant que l'on reconnaisse leur importance en médecine humaine.

A la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, John MacFadyan, directeur du Royal Veterinary College of London et pathologiste émérite, et Stewart Stockman mènent une large campagne de recherche lancée par le Bureau de la Pêche et de l'Agriculture (Board of Agriculture and Fisheries) sur les agents responsables d'avortements chez le mouton (105 cité par, 120). Cette campagne se concentre principalement sur *Brucella abortus*, mais ils décrivent également des avortements liés à un « vibron », isolé dans le mucus utérin d'une brebis et dans l'estomac de son fœtus en Février 1906. D'après les descriptions qu'ils ont pu en faire, on rattache aujourd'hui ce « vibron » à *Campylobacter fetus*.

En 1919, Smith et Taylor, aux Etats-Unis, décrivent des avortements à « vibrions » chez les bovins et baptisèrent *Vibrio fetus* l'organisme décrit par MacFadyan (169).

Ils montrèrent que les avortements à « vibrions », étaient mondialement répandus et à l'origine d'importantes chutes de performances de reproduction chez les bovins et les ovins (143).

En 1947, aux Etats-Unis, Plastring et al. montrèrent qu'il existait une forme asymptomatique de l'infection chez les taureaux transmise par la saillie provoquant des avortements précoces et à l'origine d'infertilité chez la mère ( cité par 120, 156 cité par ). Leurs travaux conduiront à l'éviction des taureaux porteurs des centres d'insémination artificielle.

En 1931, Jones et al. isolèrent un « vibrio » de bovins atteints de « dysenterie hivernale » et de veaux atteints d'entérites. Ils parvinrent à obtenir des cultures pures, sans milieu sélectif par dilutions successives de contenus digestifs récupérés par lavage et grattage de la muqueuse jéjunale. L'organisme qu'ils isolèrent était similaire à « *V.fetus* » mais possédait des propriétés antigéniques différentes. Ils le nommèrent *Vibrio jejuni*. Ce nom fut conservé dans la nomenclature actuelle avec *Campylobacter jejuni*. Leur travail ne fut pas poursuivi, probablement en raison des difficultés techniques

de survie et de l'admission du fait que la plupart des diarrhées chez les bovins étaient d'origine virale. Dans les années 40, Doyle, toujours aux Etats-Unis, isola un autre « vibrio » microaérophile qu'il pensa être à l'origine de la dysenterie porcine (qu'on sait aujourd'hui causée par *Serpulina hyodysenteriae*). Il le nomma V. Coli. (nom partiellement conservé dans la nomenclature actuelle).

Les campylobacters ne furent reconnus comme pathogènes digestifs pour l'homme qu'à la fin des années 70. Il y eut avant cela quelques isolations occasionnelles.

Vinzent et al en France isolèrent la bactérie dans un prélèvement sanguin d'une femme victime d'un avortement infectieux ( cité par 120).

En mai 1938, le premier cas bien documenté de campylobacteriose digestive d'origine alimentaire est rapporté dans l'Illinois. Trois cent cinquante détenus d'un pénitencier déclarent des gastro-entérites à la suite de la consommation de lait contaminé et des micro-organismes semblables à V jejuni sont détectés par hémoculture et dans les fèces.

A la fin des années 50, Elizabeth King fit une étude systématique de trente souches isolées sur des cas humains (à partir de sang ou d'autres fluides corporels normalement stérile). Elle fut la première à faire la distinction entre les *V. fetus* classiques se développant à 25° et à 37°C et des souches dont la température optimale de croissance était à 42°C. Elle trouva des ressemblances entre ces dernières et les souches décrites par Jones et al. (*Vibrio jejuni* et *Vibrio coli*); elle les nomme « related Vibrio » en attente d'une étude plus détaillée. Ce test de croissance à 25 et à 42°C est encore largement utilisé aujourd'hui pour l'identification des espèces.

En 1959, Florent utilisant un milieu sélectif au vert brillant distingue deux types de *Vibrio fetus* :

*Vibrio fetus* subsp. *veneralis* pour les germes responsables d'infertilité

*Vibrio fetus* subsp. *intestinalis* pour les germes isolés lors d'avortements sporadiques

L'isolement de *Campylobacter* à partir de fèces, fût réalisé en 1972, par Dekeyser (Institut National pour la Recherche Vétérinaire à Bruxelles) et Butzler (Hopital Universitaire de St Pierre).

Butzler (37cité par , 120) isola un « related vibrio » à partir du sang d'une jeune femme atteinte de diarrhée aigüe hémorragique et fébrile. A l'aide du microbiologiste Dekeyser, ils cultivèrent et isolèrent le vibriion à partir d'un échantillon de ses fèces et par la même méthode utilisée pour l'isolement de *V.fetus* (filtrations sélectives). Après cette réussite, une plus large étude fût conduite sur ces « related vibrio » (*C jejuni* et *C coli*). Ils furent isolés sur 5,3% parmi 3 000 enfants atteints de diarrhée et 1,6% sur 7 000 personnes non atteintes de diarrhées. Parallèlement chez ces enfants atteints de diarrhée, ils montrèrent l'existence d'anticorps spécifiques de *C jejuni* et qu'ils observèrent qu'ils présentaient une excellente réponse thérapeutique à l'érythromycine.

Puis la création de milieux sélectifs simplifia l'isolement en évitant les filtrations sélectives, techniquement peu commodes. Grâce aux analyses en routine sur des prélèvements de fèces de malades diarrhéiques, on prit conscience de l'ampleur du problème des diarrhées à *Campylobacter*.

En 1979, fût publiée le premier article récapitulatif sur les campylobacterioses (19). En 1980, John Penner et Hermy Lior (103, 128) au Canada travaillèrent au sérotypage des souches. En 1963, Sebald et Veron, après leurs travaux sur la teneur en bases azotées guanine et cytosine de ces bactéries(141, 162), proposent la création du genre *Campylobacter* avec comme espèce type *Campylobacter fetus*. En 1984, le Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology regroupe les *Campylobacter* et les *Spirillum* au sein d'un même taxon : les Spirillaceae ; en faveur de ressemblances morphologiques

et physiologiques. Plus tard, les travaux en taxonomie moléculaire montrèrent que ces deux familles n'avaient aucune base phylogénique.

C'est en 1987 que la position systématique des *Campylobacter* est établie (158, 159, 161). Ces travaux montrent que les *Campylobacter* appartiennent au phylum des *Proteobacteries* ; ils font partie d'une branche phylogénétiquement nouvelle (rRNA superfamily VI). Au sein de cette super famille, les genres *Campylobacter* et *Arcobacter* sont regroupés dans une même famille. On trouve également dans cette super-famille, d'autres taxons tels que *Helicobacter* non regroupés dans une famille.

## C2 : Caractères cultureux et biochimiques (49, 50)

### • Temps de génération long

La lenteur de croissance de *Campylobacter* contribue à accroître le risque d'apparition de compétiteurs dans le milieu de culture. Les compétiteurs à croissance plus rapide utilisent les nutriments et masquent, voire empêchent la croissance de *Campylobacter*. La réduction de ce temps de croissance passe par le respect rigoureux des conditions optimales de croissance de ces bactéries.

### • Température optimale de croissance

Toutes les bactéries du genre *Campylobacter* sont mésophiles. Une incubation à 37°C permet ainsi le développement de toutes les espèces connues du genre *Campylobacter*. Toutefois, la capacité de croissance à d'autres températures constitue un caractère différentiel d'espèce important. En effet, la température optimale de croissance des campylobacters thermotolérants, comme *C.jejuni* et *C.coli*, est de 42°C. Leur croissance est impossible pour une température inférieure à 25°C et limitée à 37°C.

Cette température particulière est aussi un critère qui permet de sélectionner favorablement le développement de ces bactéries par rapport à d'éventuelles bactéries compétitrices. Bien évidemment, cela ne suffit pas à éliminer tout risque de contaminants indésirables d'une culture de *Campylobacter* mais participe à en limiter le risque.

### • Milieu sélectif

*Campylobacter* est chimio-organotrophe, à métabolisme respiratoire et non fermentaire. Incapable d'utiliser les sucres, il peut se développer sur des milieux non sélectifs tels que le BHI (Brain Heart Infusion ou bouillon cœur cerveau). Il s'agit d'un milieu très riche, composé d'extrait de cœur et de cerveau, enrichi en peptone, glucose et NaCl et dépourvu d'antibiotiques (il n'empêche pas le développement de contaminants). Ce milieu ne correspond pas au cahier des charges de notre étude car, bien que peu coûteux, il introduit de forts risques de contamination de culture. Nous avons préféré utiliser un milieu sélectif de culture, le milieu de Karmali. Ce milieu gélosé dont la composition est détaillée en annexe, nous est fourni par le fabricant Oxoid. Il était précolé dans des boîtes de Pétri.

### • Atmosphère optimale

L'atmosphère optimale de culture de campylobacter est appauvrie en oxygène : entre 3 et 15%. (49). De nombreux auteurs estiment que les campylobacter seraient plus capnophiles qu'ils ne sont microaérophiles, c'est-à-dire qu'ils exigent une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> (2 à 10%) plus qu'une atmosphère appauvrie en O<sub>2</sub>.

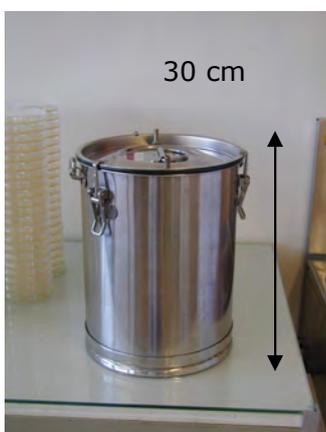


Figure A-1 : Jarre

Le mélange gazeux communément utilisé pour leur culture est le suivant : 5% d'O<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub>, et 85% de N<sub>2</sub>. Ces conditions sont aisément obtenues dans des jarres étanches remplies avec un mélange gazeux disponible en bouteille, ou dans des jarres

étanches contenant des sachets générateurs d'atmosphère microaérophile, ou bien encore dans des étuves dont l'atmosphère est régulée en permanence.

Pour cultiver les campylobactéries, nous utilisons des jarres remplies de ce mélange gazeux. La sélection d'une telle atmosphère est également un moyen de prévenir certaines contaminations, de bactéries anaérobies ou aérobies.

- Caractères bactériologiques des 18 espèces du genre *Campylobacter* - J.P. Euzéby : Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire (2007)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
<i>C. mucosalis</i>	-	+	-	-	-	+	-	+	(+)	(+)	d	-	+	(+)	(-)			(+)	-	-	(+)	-
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>Hyointestinalis</i>	+	+	-	-	-	+	(-)	+	+	(+)	+	(+)	-	-	+	-	-	-	-	(-)	+	(-)
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>Lawsonii</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	-	(-)	-	+	+	(-)	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	+	+	-	-	-	-	+	(+)	+	+	+	+	d	-	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>C. fetus</i> subsp. <i>Venerialis</i>	(+)	+	-	-	-	-	(+)	-	+	(+)	(-)	(-)	d	-	(+)	-	-	-	-	-	(+)	-
<i>C. lari</i> subsp. <i>lari</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	d	-	-	-	-	-	+	+
<i>C. concisus</i>	-	d	-	-	-	-	-	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	(+)	(-)	-	-	(-)	-	-	(+)	-
<i>C. curvus</i>	-	+	(-)	d	(-)	(-)	-	d	-	-	+	(+)	+	d	+	-	d	-	-	+	+	-
<i>C. showae</i>	+	d	-	d	-	d	-	d	-	-	d	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>C. rectus</i>	(-)	+	-	+	-	-	-	(-)	-	-	+	-	+	-	+	-	d	-	-	-	(+)	-
<i>C. sputorum</i>	d	+	-	-	-	+	-	(+)	d	d	+	-	+	-	+	-	-	+	-	d	-	-
<i>C. hominis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	d	d	+	-	+	-	d	-	-	-	+	-	d	-
<i>C. gracilis</i>	(-)	-	-	(+)	-	-	-	(+)	-	-	+	+	+	-	(+)	-	-	(-)	-	-	d	-
<i>C. upsaliensis</i>	-	+	-	+	-	-	-	(+)	+	+	+	d	-	-	+	-	-	-	-	d	-	(-)
<i>C. helveticus</i>	-	+	-	+	-	-	-	+	+	d	d	-	-	-	+	-	-	(-)	-	-	-	-
<i>C. insulaenigræ</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>C. canadensis</i>	d	+	-	-	d	d	-	+	-	-	d	-	-	-	d	+	(+)	-	-	-	d	-
<i>C. coli</i>	+	+	-	+	-	d	-	+	+	(+)	(+)	+	-	-	+	-	-	-	-	+	(-)	+
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>Doylei</i>	(+)	+	+	+	-	-	-	-	+	-	(-)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>Jejuni</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+	(+)	(+)	+	-	-	+	-	-	-	-	(+)	-	+
<i>C. lari</i>	+	+	-	(-)	d	-	-	+	+	+	+	(-)	-	(-)	+	-	-	(+)	-	(+)	(-)	+
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22

- 1) Catalase ; 2) Oxydase ; 3) Hydrolyse de l'hippurate ; 4) Indoxyl acétate estérase ; 5) uréase ; 6) H2S (TSI) ; 7) Croissance à 25 °C ; 8) Croissance à 42 °C ; 9) Croissance en présence de 1,5 p. ; cent de bile ; 10) Croissance en présence de 2 p. cent de bile ; 11) Croissance en présence de 1 p. ; cent de glycine ; 12) Croissance en présence de 0,1 p. cent de permanganate de potassium. 13) Croissance en anaérobiose ; 14) Phosphatase alcaline ; 15) Réduction des nitrites ; 16) Réduction des nitrites ; 17) γ-Glutamyl transpeptidase ; 18) Croissance en présence de 2 p. cent de NaCl ; 19) Croissance en présence de 3,5 p. cent de NaCl ; 20) Croissance en présence de 0,04 p. cent de chlorure de triphényltétrazolium ; 21) Résistance à l'acide nalidixique (30 mg/L) ; 22) Résistance à la céfalotine céfalotine (30 mg/L).

+ : toutes les souches donnent un résultat positif. +f : résultat faiblement positif. - : toutes les souches donnent un résultat négatif. (+) : 70 à 90 p. cent des souches donnent un résultat positif. (-) : 7 à 29 p. cent des souches donnent un résultat positif. d : 40 à 64 p. cent des souches donnent un résultat positif.

### C3 : Composition des milieux utilisés

	Gélose Karmali	Gélose PCA
Milieu de base	Peptone Charbon Hématine Chlorure de sodium Pyruvate de sodium Agar Eau	Extrait de levure Tryptone Glucose Agar Eau
Antibiotiques	Vancomycine Céfopérazone Cycloheximide Ethanol à 95%	

## C4 : Techniques de biologie moléculaire utilisées

### C4.1: Amplification génique par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Pour caractériser nos souches mis en évidence sur les témoins nous réalisons une PCR multiplex à l'aide d'amorces spécifiques de *Campylobacter coli* et de *Campylobacter jejuni*. *Campylobacter coli* et *Campylobacter jejuni* sont identifiés par amplification d'une séquence d'ADN de 350 pb et de 760 pb respectivement. Les amorces utilisées sont celles décrites par Van de Giessen en 1998(157) :

- Col1 : 5'-AGG CAA GGG AGC CTT TAA TC-3'
- Col2: 5'-TAT CCC TAT CTA CAA ATT CGC -3'
- Jun3 : 5'-CAT CTT CCC TAG TCA AGC CT -3'
- Jun4 5'-AAG ATA TGG CAC TAG CAA GAC -3'

La réaction de PCR a été réalisée dans un thermocycler BIORAD *icycler*.

Le volume réactionnel de 25µL avait la composition suivante : tampon PCR : 1mM ; MgC<sub>2</sub> : 2,5 mM ; Amorces : 1mM ; dNTP : 0,2mM ; Taq polymérase : 0,5 unité/25µL. Les conditions d'amplification étaient les suivantes : 95°C pendant 5min, (94°C, 1min ; 64°C ; 1min ; 72°C ; 1min) deux cycles, (94°C, 1min ; 62°C ; 1min ; 72°C ; 1min) deux cycles, refroidissement et maintien à 4°C.

La PCR est suivie d'une électrophorèse (100V, 400mA, 45min) dans du gel d'agarose 1,5% additionné de TAE (EDTA d'acétate de Tris).

### C4.2 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PGFE)

Ce type d'électrophorèse permet de séparer les grandes molécules d'ADN (> 50 kb) que l'électrophorèse classique en gel d'agarose ne permet pas de résoudre, même en diminuant au maximum la concentration d'agarose (en dessous de 0.4% les gels sont impossibles à manipuler). La porosité d'un gel d'agarose classique est inférieure au micron alors que la longueur d'une molécule d'ADN de 50 kb complètement étirée est d'environ 18 microns. Le principe de l'électrophorèse en champ pulsé consiste à alterner l'orientation du champ électrique au cours du temps. Chaque changement de champ électrique réoriente la molécule d'ADN dans le gel augmentant ainsi la probabilité que la molécule d'ADN soit orientée de façon à passer à travers les mailles du gel. Cette probabilité dépend de la taille de la molécule et la vitesse de migration d'un fragment d'ADN dans le gel varie dans le sens inverse de sa taille. L'électrophorèse en champ pulsé permet ainsi de séparer des fragments d'ADN d'une taille allant de moins de 1 kb à une dizaine de mégabases. Pour ce type d'électrophorèse, il n'est pas possible d'utiliser des ADN purifiés par les techniques classiques car ces techniques les cassent en fragments d'une taille inférieure à 100 kb. Pour éviter la cassure mécanique des molécules d'ADN les cellules sont incluses dans des blocs d'agarose.

*Campylobacter* cultivé sur gélose Karmali à 42 °C pendant une nuit. Un aliquot de la culture est prélevé à l'aide d'une öse en raclant la surface de la gélose, et mis en suspension dans 1 mL de solution (1M NaCl, 10mM Tris pH=8, 10 mM EDTA pH=8). 220 µL de cette suspension sont mélangés dans un tube Eppendorf à un égal volume d'agarose à 2% (Bio-Rad) à 56 °C, puis distribués dans les moules à plug (Bio-Rad)

Après solidification, les plugs sont démoulés et répartis dans des tubes hémolyse de 5 mL. 3 mL de solution de lyse (EDTA 50mM, Tris 50 mM, N Lauryol Sarcosine 1%, protéinase K 1 mg/mL.

Après une incubation d'une nuit à 54 °C les plugs sont lavés 4 fois 30 minutes à 40 °C dans du TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH=8)

Un demi plug est digéré pendant une nuit par l'enzyme de restriction SmaI (Biolabs) (40 unités /90 µL)

L'électrophorèse est réalisée dans un système CHEF-DRIII (Bio-Rad)

Les plugs sont inclus dans un gel à 1.3 % Bio-Rad en tampon TBE 0,5X

Les paramètres de l'électrophorèse sont les suivants :

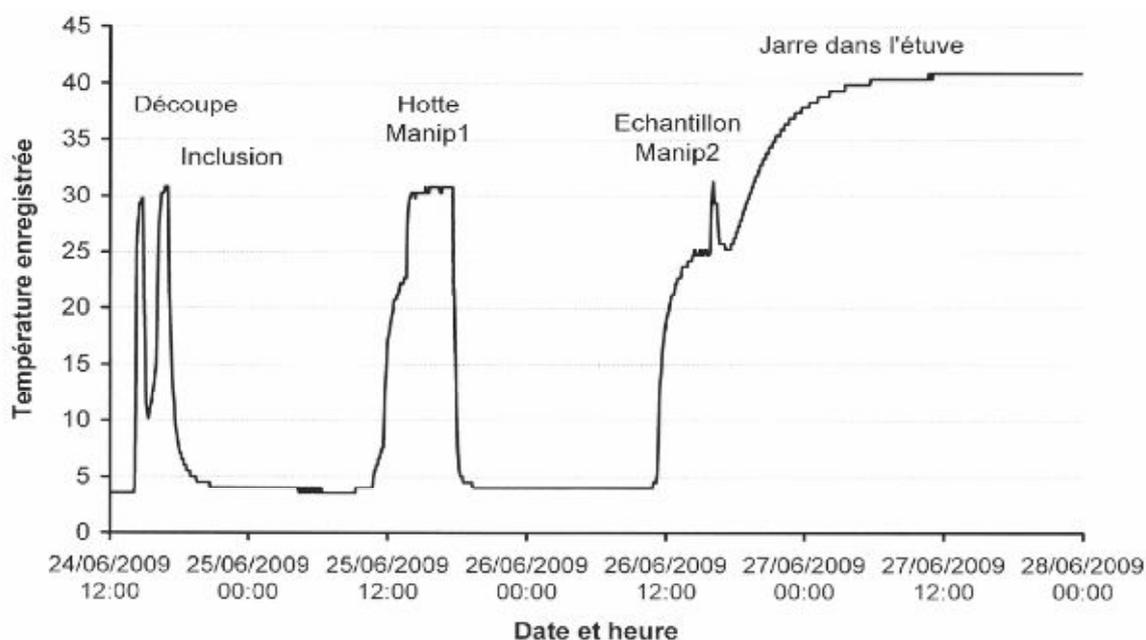
- Block 1 : initial pulse time 6 secondes ; final pulse time 30 secondes ; 21 heures
- Block 2 : initial pulse time 2 secondes ; final pulse time 5 secondes ; 3 heures
- Température 14 °C
- Voltage gradient : 6V/cm ;Angle : 120 °

Après migration les gels sont colorés par le BET pendant 2 heures et photographiés à l'aide d'un trans-illuminateur (Bio-Rad). L'analyse des photos est réalisée à l'aide du logiciel Bio1D+++ (Vilbert Lourmat).

## C5 : Température durant les manipulations

Un exemple d'enregistrement de température est représenté figure A-2. Une première élévation de température est observée lors de la découpe. Après cette opération les échantillons sont immédiatement remis dans l'étuve froide. Les échantillons Dispersion, sont repris sous la hotte afin de réaliser l'inclusion, qui correspond au deuxième pic de température. Après prise en masse, les échantillons sont à nouveau stockés au froid.

Lors de la première expérimentation, la sonde est conservée sous la hotte, la température y est supérieure à 30°C. Pendant la seconde expérimentation, la sonde suit un échantillon aux différentes étapes, dans l'étuve froide, au tempéragé à 25°C, sous la hotte et près du bec bunsen et enfin, après ensemencement dans la jarre.



Découpe-Inclusion : première journée de découpe, inclusion puis stockage au froid.

Manip 1 : première demi-journée d'expérimentation : la sonde est laissée sous la hotte

Manip 2 : deuxième demi-journée : la sonde suit un échantillon et est placée dans l'étuve en même temps que les autres boîtes Karmali issus des ensemencements réalisés lors de la manipulation.

Figure A-2 : Variation de température lors de l'élaboration d'un modèle, ici le modèle Dispersion.



## Annexe D : Données brutes

### D1 : Statistiques descriptives / modèle Pénétration

Tableau A-I : Quantité de Campylobacter par matrice et par compartiment pour le modèle Pénétration

Couenne	Produit Cp	Compartiment		
		Papier	Haut	Bas
Nombre total d'échantillons	42	42	42	42
dont supérieurs au seuil de détection	42	38	35	0
Moyenne	5,90	5,67	5,52	-
Ecart-type	1,04	1,00	1,00	-
Minimum	4,00	4,00	4,00	-
Maximum	7,36	7,14	7,20	-

Viande	Produit Vp	Compartiment		
		Papier	Haut	Bas
Nombre total d'échantillons	44	44	44	44
dont supérieurs au seuil de détection	44	43	42	44
Moyenne	5,94	5,74	5,40	-
Ecart-type	0,63	0,59	0,71	-
Minimum	4,00	4,60	4,00	-
Maximum	6,97	6,76	6,64	-

Séreuse	Produit Sp	Compartiment		
		Papier	Haut	Bas
Nombre total d'échantillons	29	29	29	29
dont supérieurs au seuil de détection	29	29	26	29
Moyenne	5,62	5,49	4,73	-
Ecart-type	0,44	0,48	0,61	-
Minimum	4,48	4,30	4,00	-
Maximum	6,73	6,72	5,88	-

Tableau A-II : Quantité de bactéries mésophiles par matrice et par compartiment pour le modèle Pénétration.

Couenne	Produit Cp	Compartiment		
		Papier	Haut	Bas
Nombre total d'échantillons	55	55	55	55
Nombre d'échantillons considérés	55	49	55	55
Moyenne	8,12	7,84	7,91	-
Ecart-type	0,83	0,43	0,82	-
Minimum	4,98	5,97	4,98	-
Maximum	9,05	8,63	8,84	-

<b>Viande</b>	<b>Produit Vp</b>	<b>Compartiment</b>		
		<b>Papier</b>	<b>Haut</b>	<b>Bas</b>
Nombre total d'échantillons	52	52	52	52
Nombre d'échantillons considérés	47	47	48	52
Moyenne	7,40	6,70	7,17	-
Ecart-type	0,60	0,72	0,89	-
Minimum	5,81	5,04	2,67	-
Maximum	8,26	7,92	8,00	-

<b>Séreuse</b>	<b>Produit Sp</b>	<b>Compartiment</b>		
		<b>Papier</b>	<b>Haut</b>	<b>Bas</b>
Nombre total d'échantillons	35	35	35	35
Nombre d'échantillons considérés	30	30	35	35
Moyenne	7,37	6,59	7,11	-
Ecart-type	0,78	0,95	1,01	-
Minimum	5,38	4,30	4,13	-
Maximum	8,16	7,58	8,10	-

Tableau A-III : Résultats campylobacters pour la Variable Retenu pour le modèle Pénétration

<b>Retenu <i>Campylobacter</i></b>	<b>Cp</b>	<b>Vp</b>	<b>Sp</b>
Nombre total d'échantillons	42	44	29
Nombre d'échantillons considérés	42	43	26
Moyenne	0,38	0,36	0,23
Ecart-type	0,40	0,28	0,24
Minimum	0,00	0,00	0,01
Maximum	1,00	1,00	0,73

Tableau A-IV : Résultats flore mésophile totale pour la Variable Retenu pour le modèle Pénétration

<b>Retenu Flore totale</b>	<b>Cp</b>	<b>Vp</b>	<b>Sp</b>
Nombre total d'échantillons	55	52	35
Nombre d'échantillons considérés	49	47	30
Moyenne	0,60	0,75	0,73
Ecart-type	0,15	0,17	0,20
Minimum	0,11	0,16	0,19
Maximum	0,94	0,98	0,99

## D2 : Statistiques descriptives / modèle Dispersion

Tableau A-V : Quantité de Campylobacter par matrice et par compartiment pour le modèle Dispersion

<b>Couenne</b>	<b>Produit Cd</b>	<b>Compartiment</b>		
		<b>Rinçat</b>	<b>Matrice</b>	<b>Agar</b>
Nombre total d'échantillons	62	62	62	62
dont supérieurs au seuil de détection	62	61	45	58
Moyenne (log UFC)	5,86	5,60	5,05	4,87
Ecart-type (log UFC)	0,83	0,84	0,91	0,91
Minimum (log UFC)	4,78	4,00	4,00	3,54
Maximum (log UFC)	7,57	7,22	7,55	6,55

<b>Viande</b>	<b>Produit Vd</b>	<b>Compartiment</b>		
		<b>Rinçat</b>	<b>Matrice</b>	<b>Agar</b>
Nombre total d'échantillons	62	62	62	62
Dont supérieurs au seuil de détection	62	62	59	56
Moyenne (log UFC)	6,04	5,72	5,51	4,99
Ecart-type (log UFC)	0,89	0,92	0,89	1,03
Minimum (log UFC)	4,37	4,00	4,00	3,48
Maximum (log UFC)	7,56	7,24	7,03	7,02

<b>Séreuse</b>	<b>Produit Sd</b>	<b>Compartiment</b>		
		<b>Rinçat</b>	<b>Matrice</b>	<b>Agar</b>
Nombre total d'échantillons	63	63	63	63
dont supérieurs au seuil de détection	63	63	59	61
Moyenne (log UFC)	6,08	5,85	5,13	5,01
Ecart-type (log UFC)	0,78	0,85	0,84	0,83
Minimum (log UFC)	4,85	4,00	4,00	3,86
Maximum (log UFC)	7,30	7,24	6,85	6,49

Tableau A-VI : Résultats campylobacters pour les différents variables du modèle Dispersion.

<b>Cd</b>	<b>Compartiment</b>		
	<b>Rincé</b>	<b>Retenu</b>	<b>Dispersé</b>
Nombre total d'échantillons	62	62	62
dont supérieurs au seuil de détection	62	47	58
Moyenne	0,67	0,24	0,16
Ecart-type	0,31	0,29	0,16
Minimum	0,02	0,00	0,00
Maximum	1,00	0,95	0,70

<b>Vd</b>	<b>Compartment</b>		
	<b>Rincé</b>	<b>Retenu</b>	<b>Dispersé</b>
Nombre total d'échantillons	62	62	62
dont supérieurs au seuil de détection	62	62	62
Moyenne	0,56	0,35	0,10
Ecart-type	0,27	0,25	0,11
Minimum	0,05	0,00	0,00
Maximum	1,00	0,93	0,57

<b>Sd</b>	<b>Compartment</b>		
	<b>Rincé</b>	<b>Retenu</b>	<b>Dispersé</b>
Nombre total d'échantillons	63	63	63
dont supérieurs au seuil de détection	63	59	61
Moyenne	0,67	0,22	0,14
Ecart-type	0,26	0,24	0,13
Minimum	0,10	0,00	0,00
Maximum	0,98	0,89	0,48

Tableau A-VII : Quantité de bactéries mésophiles par matrice et par compartiment pour le modèle Dispersion.

<b>Couenne</b>	<b>Produit Cd</b>	<b>Compartment</b>		
		<b>R</b>	<b>V</b>	<b>A</b>
Nombre total d'échantillons	71	71	71	71
Nombre d'échantillons considérés	70	70	71	71
Moyenne (log UFC)	8,11	7,65	7,77	7,23
Ecart-type (log UFC)	0,89	1,03	0,90	0,77
Minimum (log UFC)	4,48	3,73	3,81	4,27
Maximum (log UFC)	9,43	9,18	9,10	8,46

<b>Viande</b>	<b>Produit Vd</b>	<b>Compartment</b>		
		<b>P</b>	<b>H</b>	<b>B</b>
Nombre total d'échantillons	71	71	71	71
Nombre d'échantillons considérés	70	71	70	71
Moyenne	7,89	7,21	7,63	6,75
Ecart-type	0,49	0,64	0,57	0,72
Minimum	6,08	5,43	5,60	4,62
Maximum	8,66	8,23	8,52	7,71

<b>Séreuse</b>	<b>Produit Sd</b>	<b>Compartiment</b>		
		<b>R</b>	<b>V</b>	<b>A</b>
Nombre total d'échantillons	72	72	72	72
Nombre d'échantillons considérés	71	72	71	72
Moyenne	7,74	7,10	7,46	6,80
Ecart-type	0,68	0,85	0,79	0,68
Minimum	5,05	3,79	3,74	4,82
Maximum	8,58	8,12	8,30	7,75

Tableau A-VIII : Résultats flore mésophile totale pour les différentes variables du modèle Dispersion

<b>Cd</b>	<b>Compartiment</b>		
	<b>Rincé</b>	<b>Retenu</b>	<b>Dispersé</b>
Nombre total d'échantillons	71	71	71
dont supérieurs au seuil de détection	70	70	70
Moyenne	0,38	0,47	0,15
Ecart-type	0,11	0,12	0,11
Minimum	0,03	0,03	0,06
Maximum	0,56	0,83	0,72

<b>Vd</b>	<b>Compartiment</b>		
	<b>Rincé</b>	<b>Retenu</b>	<b>Dispersé</b>
Nombre total d'échantillons	71	71	71
Nombre d'échantillons considérés	70	70	70
Moyenne	0,28	0,62	0,10
Ecart-type	0,19	0,22	0,07
Minimum	0,01	0,03	0,01
Maximum	0,92	0,98	0,30

<b>Sd</b>	<b>Compartiment</b>		
	<b>Rincé</b>	<b>Retenu</b>	<b>Dispersé</b>
Nombre total d'échantillons	72	72	72
Nombre d'échantillons considérés	71	71	71
Moyenne	0,29	0,57	0,15
Ecart-type	0,17	0,18	0,13
Minimum	0,01	0,05	0,01
Maximum	0,78	0,94	0,88

## D3 - Analyse de variance par produit : modèle Pénétration, variable Retenu

### D3.1. Résultats Campylobacter

Par une ANOVA, on montre qu'il y a un effet significatif du mode d'étalement pour les matrices Couenne, Viande et Séreuse. (Figures A-3 à A-5). Lorsque la surface de contact des campylobacters avec la surface de la matrice est augmentée par étalement à l'ose, la quantité de campylobacters qui persistent sur la viande est augmentée (étalement facilite l'adhésion ?). Si quelque soit la matrice, il n'apparaît pas d'effet souche, l'effet du temps de contact est significatif sauf pour la matrice couenne.

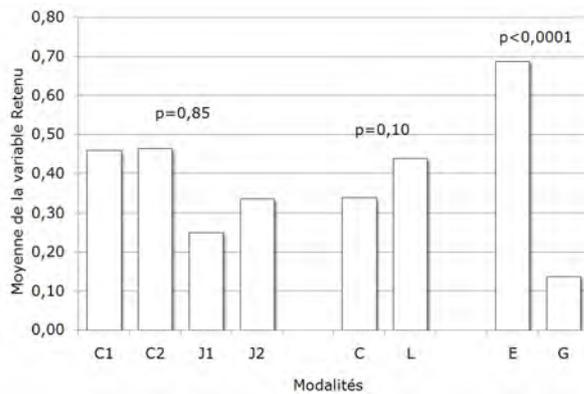


Figure A-3 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour Campylobacter, matrice Couenne, modèle Pénétration.

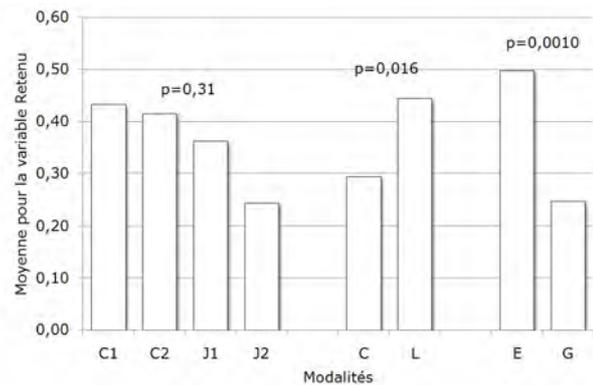


Figure A-4 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour Campylobacter, matrice Viande, modèle Pénétration.

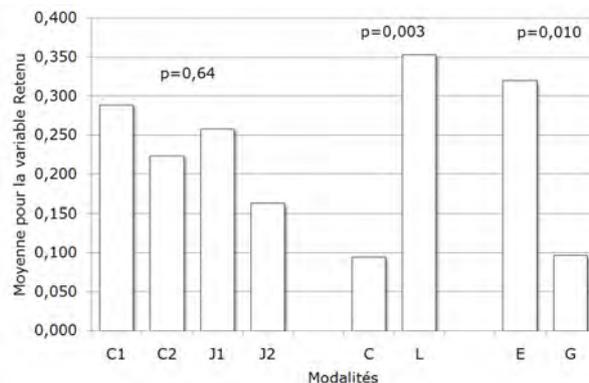


Figure A-5 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour Campylobacter, matrice Séreuse, modèle Pénétration.

### D3.2. Résultats Flore totale

Les résultats de l'analyse de variance pour la Variable Retenu pour la flore totale sont représentés figure A-6 à A-8. Il est difficile d'envisager une hypothèse d'explication pour la significativité de l'effet souche inoculée pour la matrice Séreuse.

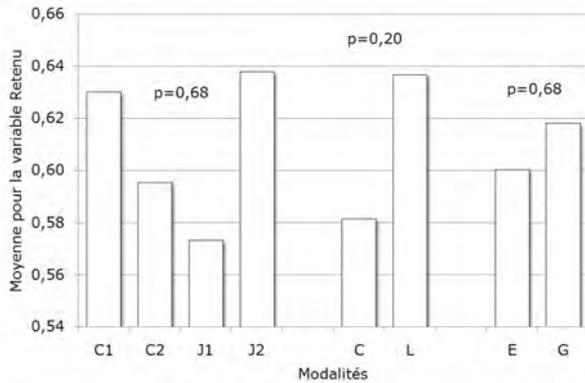


Figure A-6 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour la flore totale, matrice Couenne, modèle Pénétration.

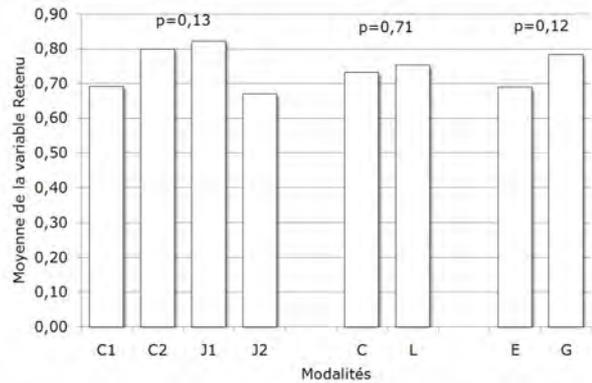


Figure A-7 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour la flore totale, matrice Viande, modèle Pénétration.

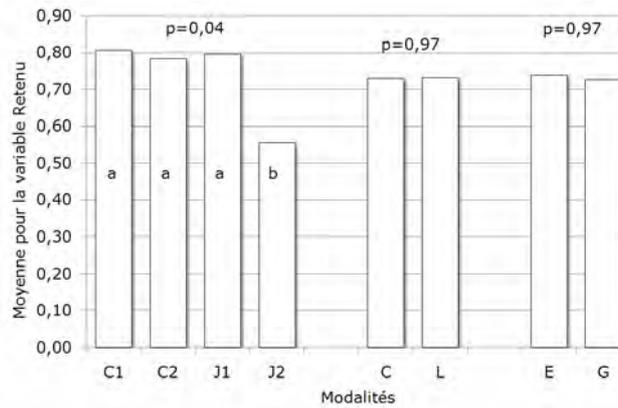


Figure A-8 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour la flore totale, matrice Séreuse, modèle Pénétration.

## D4 - Analyse de variance par produit : modèle Dispersion, flore Campylobacter

### D4.1 Variable Retenu

Par une ANOVA, on montre que pour les matrices Couenne, Séreuse et Viande, il existe un effet du mode d'étalement ( $p=0,001$ ,  $p<0,0001$  et  $p<0,0001$  respectivement) (Figures A-9 à A-11). Lorsque la surface de contact des campylobacters avec la surface de la matrice est augmentée par étalement à l'öse, la quantité de campylobacters qui persistent sur la viande est augmentée (étalement facilite l'adhésion ?).

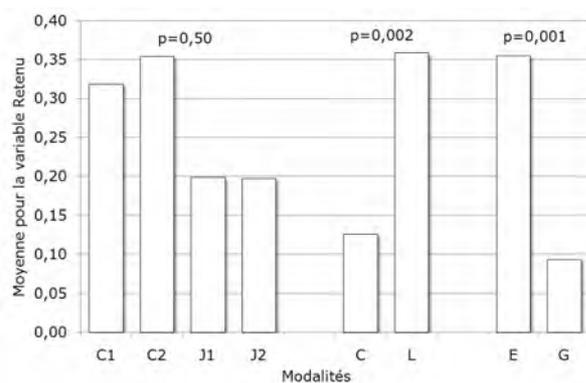


Figure A-9 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour Campylobacter, matrice Couenne, modèle Dispersion

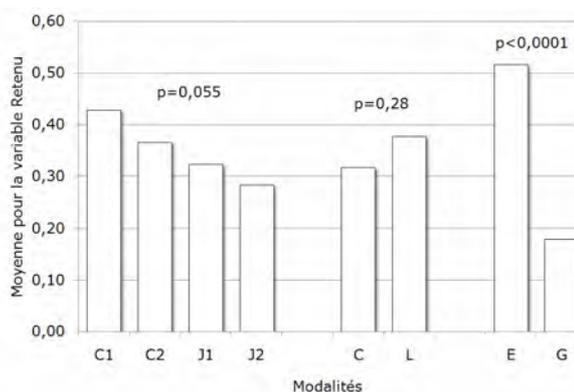


Figure A-10 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour Campylobacter, matrice Viande, modèle Dispersion

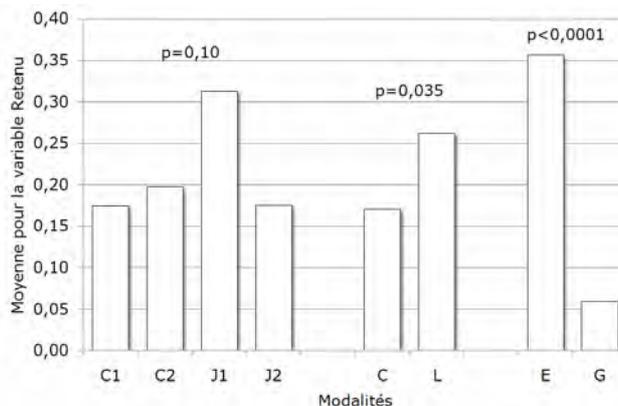


Figure A-11 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour Campylobacter, matrice Séreuse, modèle Dispersion

Pour les matrices Couenne et Séreuse, il existe un effet du temps de contact ( $p=0,002$ .et  $p=0,035$  respectivement). Pour ces deux matrices, plus le temps de contact est long et plus l'ensemencement est réalisé sur une grande surface, plus la quantité de Campylobacter retenus est importante (organisation des bactéries en surface).

Quelle que soit la matrice, en modèle Dispersion, la nature de la souche n'a aucune influence sur la quantité de bactéries retenues. Pour la matrice Viande, seul l'effet du mode d'étalement est significatif. Cette absence d'effet temps est peut être lié aux irrégularités de la surface de la viande.

### D4.2 Variable Rincé

Pour les matrices Couenne, Viande et Séreuse (Figures A-12 à A-14), nous observons qu'il existe un effet du mode d'étalement sur la proportion de bactéries lessivées avec le rincage ( $p < 0,0001$ ).

En effet, plus la surface de contact est faible, plus la quantité de bactéries lessivées est importante. Il existe par ailleurs, pour les matrices Couenne et Séreuse un effet du temps de contact ( $p = 0,002$  et  $p = 0,0015$  respectivement). Lorsque le temps de contact est court, la proportion de campylobacters lessivés est plus importante. Il n'existe par ailleurs pas d'effet souche pour ce paramètre.

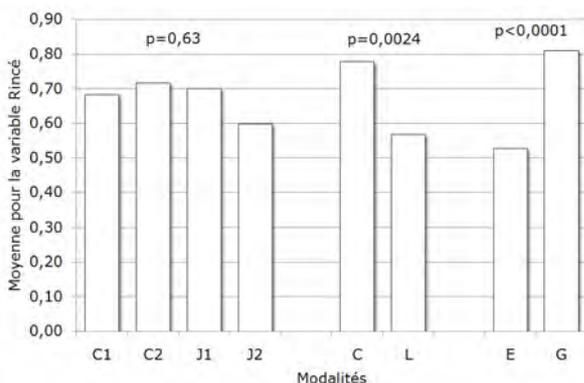


Figure A-12 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Rincé pour Campylobacter, matrice Couenne, modèle Dispersion

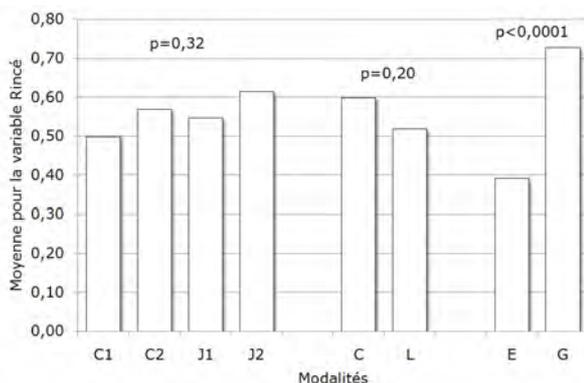


Figure A-13 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Rincé pour Campylobacter, matrice Viande, modèle Dispersion

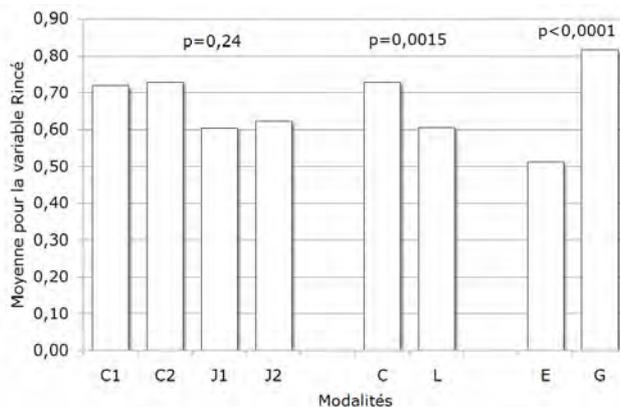


Figure A-14 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Rincé pour Campylobacter, matrice Séreuse, modèle Dispersion

### D4.3 Variable Dispersé

Hormis un effet souche peu net pour la matrice Sérouse ( $p=0,050$ ), nous ne mettons en évidence aucun effet marqué du temps de contact, de la souche et du mode sur la proportion de bactéries dispersée sur l'agar (Figures A-15 à A-17).

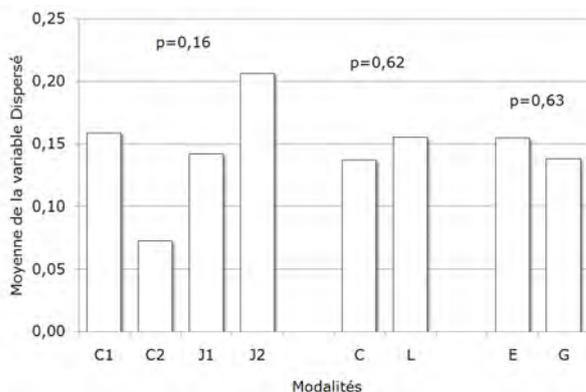


Figure A-15 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Dispersé pour Campylobacter, matrice Couenne, modèle Dispersion

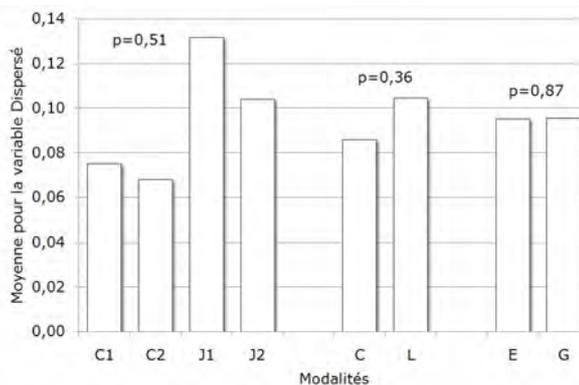


Figure A-16 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Dispersé pour Campylobacter, matrice Viande, modèle Dispersion

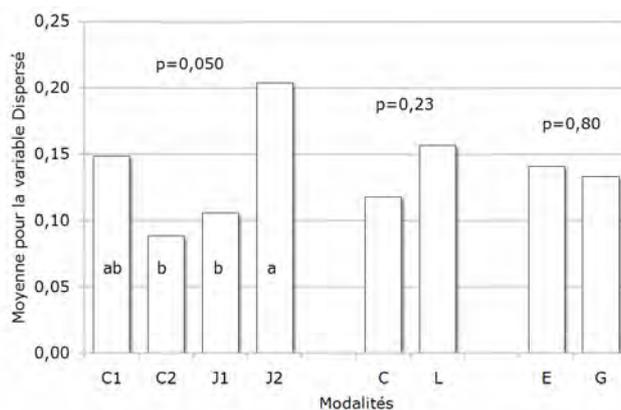


Figure A-17 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Dispersé pour Campylobacter, matrice Sérouse, modèle Dispersion

## D5 - Analyse de variance par produit : modèle Dispersion, flore mésophile totale

### D5.1 Variable Retenu

Très peu de facteurs influencent la quantité de flore totale retenue sur la viande (Figures A-18 à A-20). Nous observons un effet du temps en matrice Viande : plus le temps de contact est long, plus la proportion de bactéries retenues est importante. En matrice Séreuse nous observons un effet du mode d'étalement : lorsque l'inoculum de campylobacters est déposé en gouttes, cela favorise la persistance des bactéries de la flore totale sur le carré de matrice.

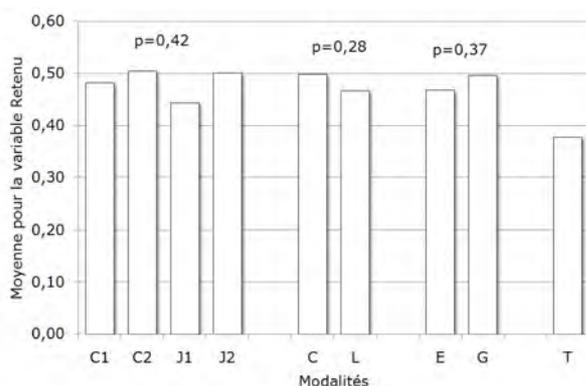


Figure A-18 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour la flore totale, matrice Couenne, modèle Dispersion

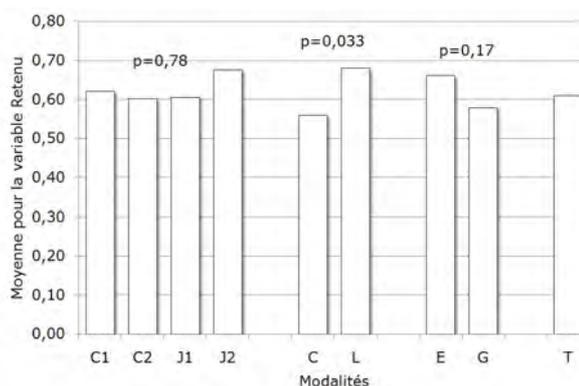


Figure A-19 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour la flore totale, matrice Viande, modèle Dispersion

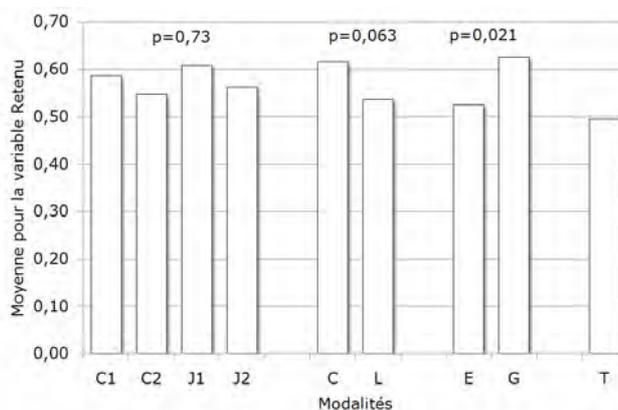


Figure A-20 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Retenu pour la flore totale, matrice Séreuse, modèle Dispersion

## D5.2 Variable Rincé

La variable Rincé en flore totale ne montre aucun effet du temps de contact, de la souche bactérienne et du mode d'étalement (Figures A-21 à A-23). Seul un effet du temps de contact apparaît pour la matrice Viande ( $p=0,018$ ) : plus celui-ci est court plus la quantité de flore totale rincée est importante. Remarquons que pour les témoins, en matrice Couenne, la proportion de bactéries lessivées est significativement moins importante.

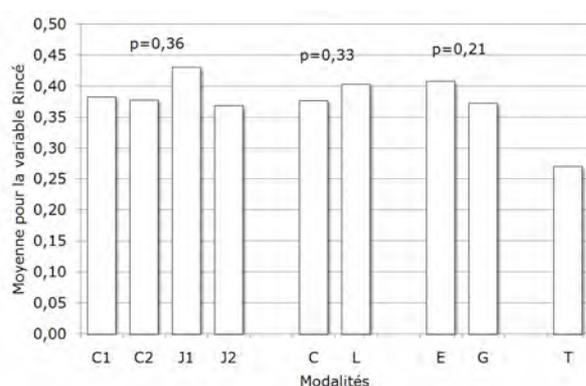


Figure A-21 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Rincé pour la flore totale, matrice Couenne, modèle Dispersion

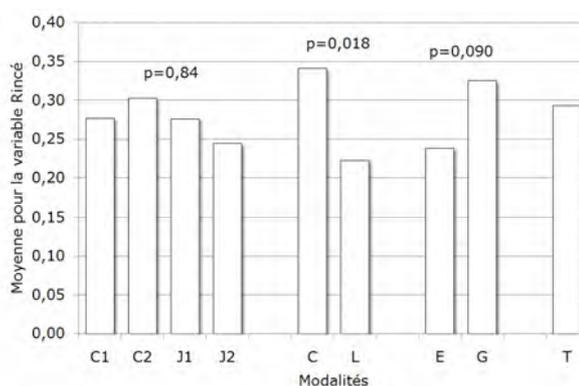


Figure A-22 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Rincé pour la flore totale, matrice Viande, modèle Dispersion

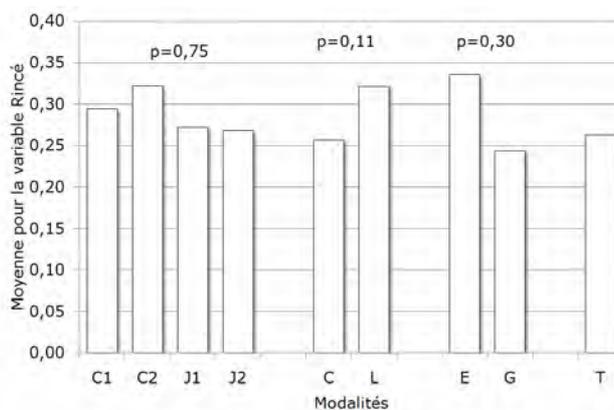


Figure A-23 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Rincé pour la flore totale, matrice Séreuse, modèle Dispersion

### D5.3 Variable Dispersé

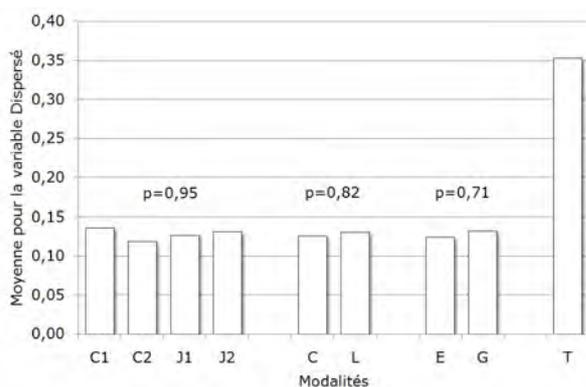


Figure A-24 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Dispersé pour la flore totale, matrice Couenne, modèle Dispersion

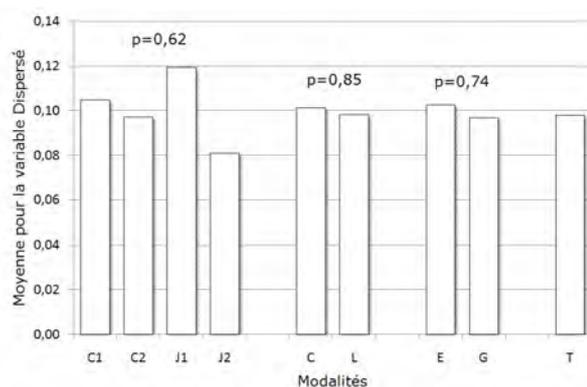


Figure A-25 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Dispersé pour la flore totale, matrice Viande, modèle Dispersion

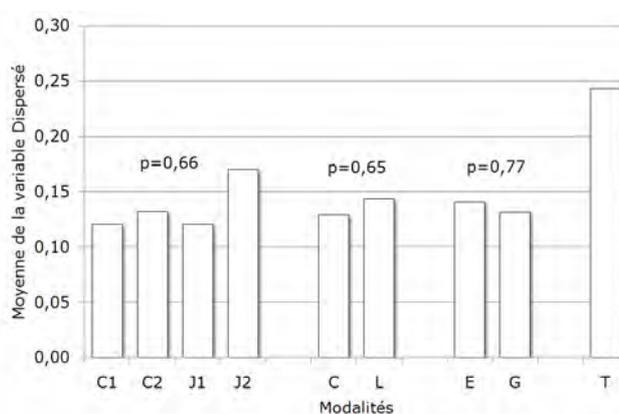
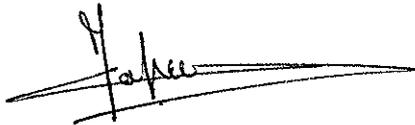


Figure A-26 : Moyennes par facteurs de variation pour la Variable Dispersé pour la flore totale, matrice Séreuse, modèle Dispersion

Pour la variable Dispersé, il n'y a aucun effet du temps de contact, du mode d'étalement ou de la souche bactérienne (Figures A-24 à A-26). Remarquons que pour la matrice Couenne, la proportion de bactéries dispersées pour les témoins est significativement plus importante.



Vu : Le Professeur Rapporteur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire  
de Nantes

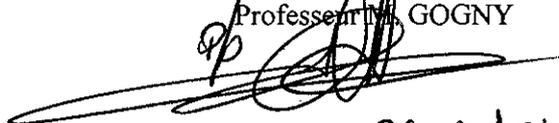


Professeur MAGRAS Catherine

Vu : Le Directeur de l'Ecole  
Nationale Vétérinaire de Nantes

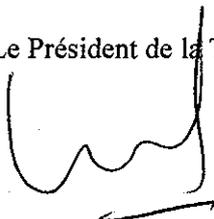
Hervé POULIQUEN, Professeur  
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE  
BP 40706 - 44307 NANTES Cedex 3  
Tél. 02 40 68 76 31 - Fax 02 40 68 77 42  
email : pouliquen@vet.nantes.fr

et par délégation  
Professeur J.M. GOGNY



Nantes, le 26 octobre 2003

Vu : Le Président de la Thèse



Professeur LOMBRAIL

Vu : Le Doyen de la Faculté  
de Médecine de Nantes

Professeur J.M. ROGEZ

Vu et permis d'imprimer

Nom : JAY  
Prénom : Maryne

ELABORATION D'UN MODELE EXPERIMENTAL D'ETUDE DE LA  
CONTAMINATION D'ORIGINE DIGESTIVE DE SURFACE DES VIANDES  
APPLICATION AU DANGER CAMPYLOBACTER

**Résumé :** La présence de *Campylobacter* sur les viandes, responsable de la majorité des zoonoses alimentaires bactériennes, peut être considérée comme un témoin d'une contamination d'origine digestive de la surface de la matrice carnée durant le processus d'abattage. Afin d'évaluer les effets de méthodes correctives simples, le parage et le douchage, sur le comportement (adhésion, dispersion, pénétration) des bactéries, deux modèles expérimentaux ont été développés sur 339 échantillons, 3 matrices carnées testées, 6 variables calculées à partir de dénombrements bactériens dans les 6 compartiments créés. Il n'a pas été détecté de pénétration de *Campylobacter* en profondeur de la matrice. Un parage maîtrisé selon les bonnes pratiques hygiéniques assure selon les exigences réglementaires le retrait de la surface dangereuse. Le douchage réduit partiellement et de façon variable la population bactérienne et conduit à une dispersion des contaminants. Le comportement d'adhésion variable en fonction des bactéries testées amène à proposer l'utilisation de ces modèles pour caractériser d'autres dangers bactériens avérés.

**Summary:** *Campylobacter* is involved in the majority of food-borne bacterial zoonoses and can be considered as an indicator of digestive contents contamination of the meat surface that occurred during the slaughtering process. In order to assess the effect of simple decontamination treatments, trimming and water wash, on bacteria (attachment, spreading, penetration), two experimental models have been developed. The results of the 339 samples composed of three compartments each from three meat matrices enable us to work out six variables calculated from bacterial counts of the different compartments. Penetration of *Campylobacter* into meat has not been proved. Trimming executed in hygienic conditions as requested by the regulation provide the withdrawal of the dangerous meat surface. Water wash reduces partially and variably bacterial population and leads to a dispersion of contaminants. Since the bacterial attachment depends on the tested bacteria, these models could be used to characterize other bacterial hazards.

**Mots clés :** *Campylobacter*, Modèle, Matrices carnées, Contamination digestive, Adhésion, Pénétration, Dispersion

**Key words:** *Campylobacter*, model, meat matrices, digestive content contamination, adhesion, dispersion, penetration

## JURY

Monsieur Pierre LOMBRIL,	Professeur de Santé Publique à la Faculté de Médecine de Nantes
Madame Christine FOURICHON	Maître de conférences en Zootechnie, Economie à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes
Madame Catherine MAGRAS	Professeure en Hygiène et Qualité des Aliments à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes
Monsieur Michel LAROCHE	Chargé de Recherches UMR INRA 1014 SECALIM