

Microbiologie et toxicologie des aliments

Hygiène et sécurité alimentaires

Guy Leyral - Elisabeth Vierling



Sciences des aliments
Série dirigée par G. Leyral

4^e édition

SCÉRÉN
CRDP
AQUITAINE

doin
éditeurs

SOMMAIRE

PREMIÈRE PARTIE - MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS

Chapitre I - Diversité du monde microbien	13
1. De la notion de microbe à celle de bactérie	13
2. Les Protistes eucaryotes : principaux groupes	14
3. Principaux champignons d'intérêt alimentaire	20
4. Diversité du monde bactérien - Anatomie fonctionnelle des bactéries	25
Chapitre II - Physiologie bactérienne	37
1. Nutrition – Notion de milieu de culture	37
2. Multiplication	44
3. Croissance des populations bactériennes	46
4. Métabolisme	52
5. Les rapports entre les bactéries et les organismes hôtes	66
Chapitre III - Micro-organismes et aliments	77
1. Les flores microbiennes des aliments : évolution et rôles	77
2. Transformations des aliments par les micro-organismes	82
Chapitre IV - Infections alimentaires d'origine microbienne	99
1. Définitions et caractères généraux.....	99
2. Agents infectieux responsables de toxi-infections alimentaires	100
3. Les éléments du diagnostic d'une toxi-infection alimentaire collective (TIAC)	132
4. Surveillance des TIAC	132
Chapitre V - Parasitoses d'origine alimentaire	135
1. Helminthiases d'origine alimentaire	135
2. Parasitoses d'origine alimentaire impliquant des protozoaires	146
Chapitre VI - Conservation des aliments	151
1. Procédés de conservation utilisant la destruction des micro-organismes par la chaleur	151
2. Procédés de stabilisation des aliments utilisant le froid	157
3. Conservation des aliments par déshydratation	160
4. Stabilisation des aliments par traitements chimiques – Les conservateurs	161
5. Traitements par rayonnements ionisants	163
6. Conservation sous atmosphère modifiée enrichie en dioxyde de carbone	167

DEUXIÈME PARTIE - HYGIÈNE ALIMENTAIRE APPLIQUÉE À LA RESTAURATION COLLECTIVE

Chapitre VII - Les bases réglementaires de l'hygiène des aliments	171
Chapitre VIII - Éviter les apports microbiens	179
1. En amont des préparations : produire des matières premières peu contaminées	179
2. Hygiène des locaux en restauration collective	189
3. Hygiène du matériel en restauration collective	194
4. Hygiène du personnel	196
5. Établissement des procédures contribuant à la sécurité alimentaire : la méthode HACCP	196
6. Réglementation	198
Chapitre IX - Limiter la multiplication des germes : hygiène des préparations et des transports	205
1. Hygiène des préparations	205
2. Quelques pratiques culinaires en rapport avec l'hygiène	206
3. Conditions hygiéniques applicables au transport des aliments	214
Chapitre X - Produits de nettoyage et de désinfection	223
1. Classification et propriétés des désinfectants	223
2. Mode d'action	224
3. Liste des produits autorisés	225
Chapitre XI - L'analyse microbiologique des aliments.....	233
1. Les prélèvements	233
2. L'analyse	234
3. Critères microbiologiques fixés par le règlement européen	235
4. L'interprétation des résultats	241

TROISIÈME PARTIE - TOXICOLOGIE ALIMENTAIRE

Chapitre XII - Méthodes d'étude en toxicologie	245
1. Les tests toxicologiques.....	245
2. Les paramètres significatifs	246
3. Principes généraux régissant l'évaluation toxicologique des additifs alimentaires	247
Chapitre XIII - Nature et origine des substances à potentialités toxiques dans les aliments	249
1. Constituants naturels des aliments	249
2. Substances toxiques d'origine non microbienne contaminant les aliments	252
3. Substances toxiques dues à une contamination microbienne des aliments	253
4. Substances vénéneuses	253
5. Étude particulière de quelques contaminants	253

Chapitre XIV - L'action des toxiques	257
1. Les voies de pénétration dans l'organisme.....	257
2. Pénétration dans l'organisme	257
3. Devenir des xénobiotiques	257
4. Étude de la biotoxification	258
5. Interaction avec les molécules du tissu cible	258
6. Risque mutagène et cancérogène	260
Chapitre XV - Toxicité des métaux et de l'arsenic	267
1. Le plomb (Pb)	267
2. Le cadmium (Cd).....	267
3. Le mercure (Hg)	268
4. Le chrome (Cr)	269
5. L'étain (Sb)	269
6. L'aluminium (Al)	270
7. L'arsenic (As)	270
8. Conclusion	270
Chapitre XVI - Les pesticides ou produits antiparasitaires	271
1. Essai de classification des pesticides selon le mode d'action et les cibles.....	271
2. Dangers des pesticides	277
3. La réglementation	277
4. Effets positifs des traitements technologiques sur les pesticides	277
Chapitre XVII - Les mycotoxines	279
1. La contamination par les moisissures	279
2. Particularités de la réglementation concernant les mycotoxines.....	281
3. Détection des mycotoxines	281
Chapitre XVIII - Les adjuvants de l'alimentation animale et les médicaments vétérinaires	283
1. Les additifs dans l'alimentation animale	283
2. Les médicaments vétérinaires	284
3. Les hormones anabolisantes et les viandes.....	284
BIBLIOGRAPHIE	287

Première partie

Microbiologie des aliments

CHAPITRE I - Diversité du monde microbien

CHAPITRE II - Physiologie bactérienne

CHAPITRE III - Micro-organismes et aliments

CHAPITRE IV - Infections alimentaires d'origine microbienne

CHAPITRE V - Parasitoses d'origine alimentaire

CHAPITRE VI - Conservation des aliments

CHAPITRE I

DIVERSITÉ DU MONDE MICROBIEN

1. De la notion de microbe à celle de bactérie

Le terme de microbe (synonyme micro-organisme) se rapporte à l'ensemble des êtres vivants dont l'observation ne peut être faite à l'œil nu et dont les cellules ne sont pas différenciées ni assemblées en tissus. La plupart sont unicellulaires ou de structure coenocytique. Cette définition des micro-organismes recouvrait jadis celle des Protistes, troisième règne créé en 1868, sur la proposition de Haeckel, à côté du règne animal et du règne végétal. Selon la nouvelle classification (1991) des êtres vivants en cinq règnes (*voir tableau 1*), les micro-organismes sont répartis sur trois règnes: ceux des Procaryotes, des Protistes eucaryotes et des Mycètes, sans les recouvrir entièrement, les Algues et les Champignons comprenant des espèces pluricellulaires de dimension macroscopique.

Règne	Procaryotes	Protistes eucaryotes	Mycètes	Animaux	Végétaux
Principaux groupes	Bactéries	Algues Protozoaires	Levures – Moisissures – Champignons vrais		
Type cellulaire	procaryote	eucaryote	eucaryote	eucaryote	eucaryote
Organisation biologique	unicellulaires	unicellulaires pluricellulaires (algues macroscopiques)	unicellulaires pluricellulaires coenocytiques	pluricellulaires	pluricellulaires
Taille	microscopiques	microscopiques	microscopiques macroscopiques	macroscopiques macroscopiques	macroscopiques

Tableau 1 – Classification des êtres vivants

À l'examen de l'ultrastructure des micro-organismes, on s'aperçoit que deux groupes peuvent être nettement différenciés:

- les **micro-organismes eucaryotes** dont l'organisation cellulaire est proche de celle des végétaux ou des animaux. Dans cet ensemble sont classés:
 - les Champignons,
 - les Protozoaires,
 - les Algues;
 - les **micro-organismes procaryotes**, dont l'organisation cellulaire est plus rudimentaire, rassemblent la totalité des bactéries.
- On trouvera, dans le *tableau 2*, les principaux critères de différenciation entre les cellules des organismes procaryotes et eucaryotes.

	Procaryotes	Eucaryotes
Noyau	Pas de membrane nucléaire. Un seul chromosome. Pas de mitose	Présence d'une membrane nucléaire. Plusieurs chromosomes. Mitose.
Paroi	Présence d'une paroi rigide incluant du peptidoglycane (hétéropolymère d'acétyl glucosamine et d'acide acétyl muramique contenant de l'acide diaminopimélique).	Pas de paroi rigide pour la cellule animale. Présence d'une paroi rigide sans peptidoglycane de nature cellulosique, celluloso-pectique ou chitineuse chez les Végétaux, les Algues et les Mycètes.
Mitochondries	Absentes. Les enzymes de la phosphorylation oxydative sont situées dans la membrane cytoplasmique.	Présentes avec les enzymes de la phosphorylation oxydative.
Appareil de Golgi	Absent.	Présent.
Stérols	Absents.	Présents dans les différentes membranes internes.

Tableau 2 – Principaux critères de différenciation

Les virus sont des organismes acellulaires. Ils doivent être considérés à part.

2. Les Protistes eucaryotes: principaux groupes

2.1. Les Algues unicellulaires

Ce sont les seuls Protistes eucaryotes autotrophes car dotés de chloroplastes et pratiquant la photosynthèse. Les Algues unicellulaires se différencient par la nature de leurs pigments, la présence ou l'absence d'une paroi, le nombre et la disposition des flagelles.

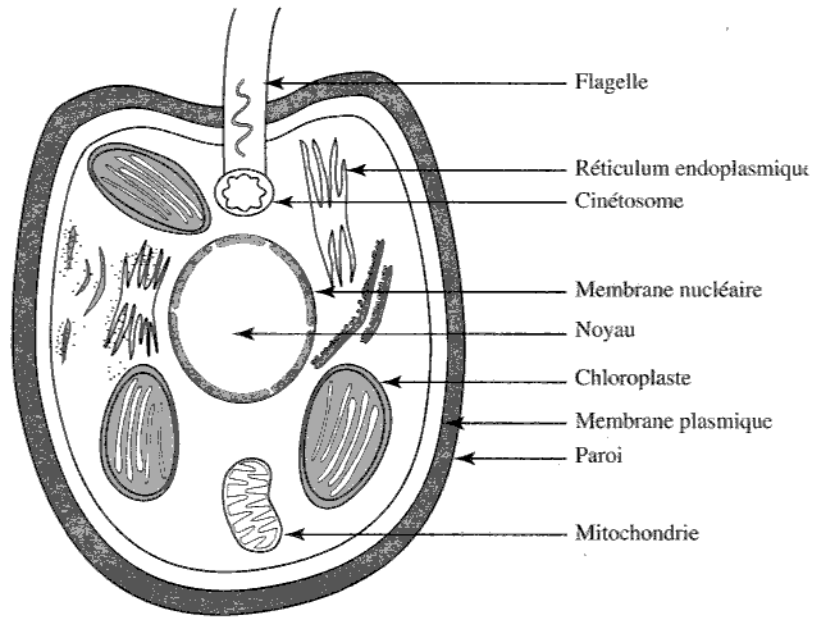


Fig. 1 – Structure schématisée d'une algue unicellulaire

	Nature de la chlorophylle	Pigment caroténoïde	Paroi	Flagelles
Algues vertes	a + b	-	cellulosique	2 identiques
Euglena	a + b	-	pas de paroi	1 à 3
Dinoflagellés	a + c	+	cellulosique	2
Diatomées et Chrysophytes	a ou a + c	+	pas de paroi	2

Tableau 3 – Classification simplifiée des Algues unicellulaires

2.2. Les Protozoaires

Ce sont, parmi les Protistes, ceux dont la structure se rapproche le plus de celle de la cellule animale. Ils ne possèdent pas de paroi, leur membrane la plus externe est la membrane cytoplasmique. La plupart sont mobiles. Il existe quatre groupes principaux de Protozoaires.

2.2.1. Les Rhizopodes

Ils se déplacent en formant des pseudopodes, prolongements protoplasmiques qui leur permettent aussi d'englober diverses particules.

Ce sont les Amibes dont certaines sont pathogènes pour l'homme.

2.2.2. Les Flagellés

Ils sont caractérisés par la possession d'un petit nombre d'organes locomoteurs longs et fins, s'insérant sous la membrane cytoplasmique: les flagelles.

Les battements de ces flagelles sont à l'origine du mouvement des cellules.

On trouve, parmi les Protozoaires flagellés, des organismes responsables de maladies humaines: les *Trypanosomes*, responsables de la maladie du sommeil, les *Leishmanies* parmi lesquelles figure l'agent du kala azar, *Trichomonas vaginalis*, responsable de leucorrhées.

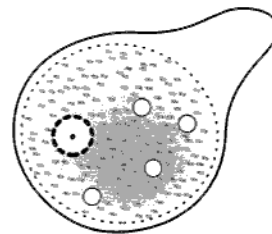


Fig. 2 – Un exemple d'amibe: *Entamoeba histolytica*

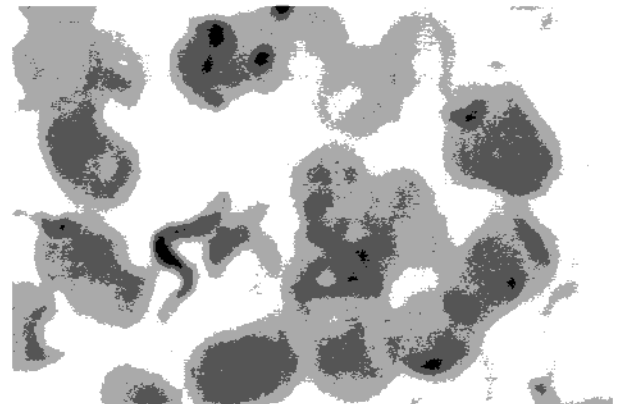


Fig. 3 – Trypanosome

2.2.3. Les Ciliés

Chez les Ciliés, la cellule est entourée de nombreux cils, formations plus courtes que les flagelles et dont les battements engendrent le déplacement. Parmi les plus connus et les plus répandus (on les trouve en abondance dans toute macération végétale), figurent les Paramécies.

2.2.4. Les Sporozoaires

Ce sont de petits Protozoaires immobiles, parasites obligatoires, au cycle évolutif complexe. Dans ce groupe, figurent les *Plasmodium*, responsables du paludisme et de la malaria.

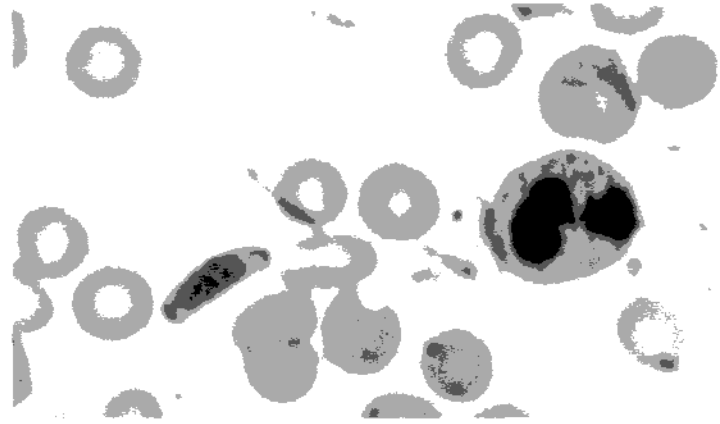


Fig. 4 – *Plasmodium*

2.3. Les Champignons

Les Champignons microscopiques sont des organismes filamenteux (moisissures) ou unicellulaires (levures), capables de se développer en saprophytes ou parasites sur tous les milieux, comme et avec les bactéries.

Ce sont des organismes hétérotrophes dépourvus de chlorophylle, ce qui les différencie à la fois des algues et des végétaux.

2.3.1. Organisation interne

2.3.1.1. La cellule fongique

Elle est constituée (fig. 5) des éléments classiques d'une cellule eucaryote :

- un ou plusieurs noyaux limités par une membrane nucléaire et renfermant plusieurs chromosomes ;
- un cytoplasme contenant :
 - des mitochondries,
 - des ribosomes,
 - des granulations de réserves constituées de glycogène ou de tréhalose,
 - une volumineuse vacuole apparaissant surtout chez les cellules âgées.

Elle est limitée par deux enveloppes :

- la membrane plasmique ;
- la paroi, formation épaisse et rigide.

La constitution de cette paroi est différente de celle des bactéries ; elle est riche en chitine, en cellulose et en callose. Selon les espèces, d'autres polysides, souvent azotés, peuvent y être identifiés comme le chitosane chez les Mucorales ou les mannanes chez les Levures.

Certains champignons sont dépourvus de paroi, la cellule fongique prend alors le nom de **plasmode**, c'est le cas des Myxomycètes.

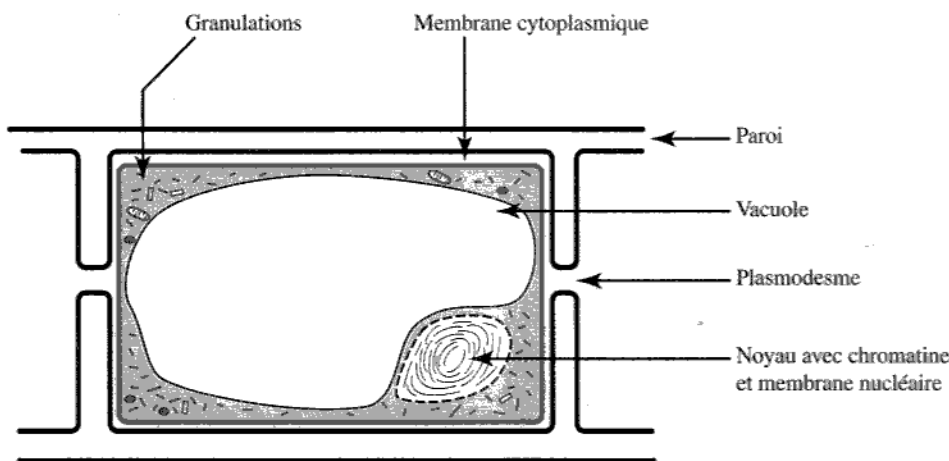


Fig. 5 – La cellule fongique

2.3.1.2. L'organisation des cellules fongiques en hyphes, notion de thalle

Les cellules fongiques sont rassemblées en filaments plus ou moins ramifiés appelés hyphes. Leur enchevêtrement constitue le thalle qui se présente sous la forme d'un feutrage plus ou moins dense.

Ces filaments sont non cloisonnés dans le cas des Phycomycètes (fig. 6), cloisonnés chez les Septomycètes (fig. 7).

Dans ce dernier cas, les cloisons sont perforées, les solutions de continuité entre cellules portent le nom de plasmodesmes (voir fig. 5).

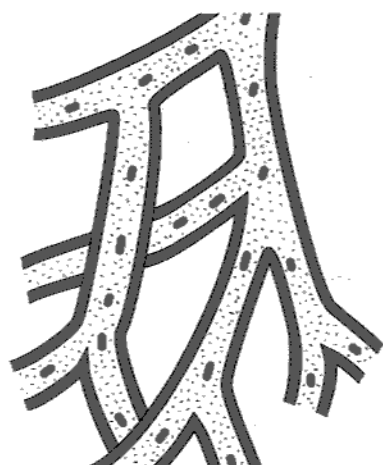


Fig. 6 – Hyphe non cloisonnée

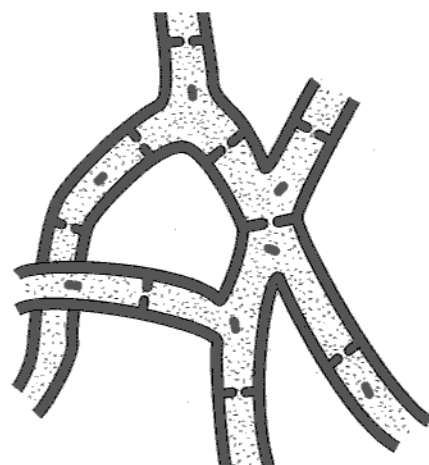


Fig. 7 – Hyphe cloisonnée

Les hyphes peuvent engendrer des formations un peu plus différenciées et adaptées, en général, aux fonctions de reproduction ou de dissémination du champignon.

Le cas des levures est particulier. Ces champignons sont unicellulaires. Le thalle est alors constitué de l'ensemble des cellules dispersées, on parle de thalle levuriforme. Les levures peuvent engendrer des filaments qui ne sont pas des hyphes et portent le nom de pseudo-mycélium.

2.3.1.3. Les organes de reproduction et de dissémination

Ces fonctions sont assurées par des spores, parmi lesquelles, on peut distinguer :

- les spores issues de la reproduction sexuée, qui résultent d'une fécondation et d'une méiose ;
- les spores d'origine végétative qui sont issues de simples mitoses.

2.3.2. Systèmes de reproduction

2.3.2.1. La reproduction asexuée

Elle est assurée par la production de spores qui se différencient à partir des cellules fongiques. Trois mécanismes principaux peuvent être rencontrés.

1 – Des spores sont produites par transformation des cellules du thalle : thallospores (synonyme : arthrospores).

Un mycélium arrête sa croissance, les cellules terminales se différencient, se divisent et se séparent. C'est le cas de *Trichophyton* (spores bourgeonnantes). Chez *Geotrichum*, les spores sont produites par la fragmentation d'une hyphe (spores non bourgeonnantes).

Dans le cas particulier de *Candida albicans*, les spores sont produites par le bourgeonnement des cellules d'un pseudo-mycélium ; elles restent soudées pour former des bouquets de blastospores, puis sont libérées, assurant la dissémination de l'espèce.

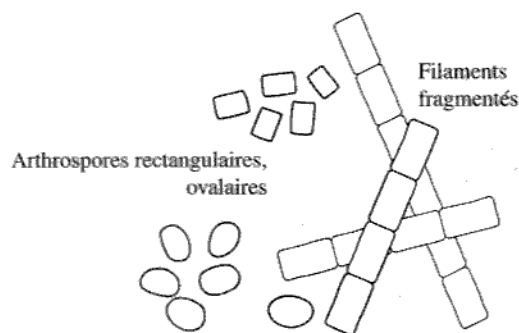


Fig. 8 – *Geotrichum*

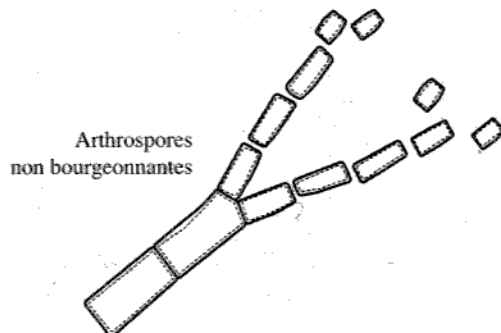


Fig. 9 – *Trichosporon*

2 – Des cellules fongiques se multiplient et se différencient pour former une cellule particulière, le conidiophore, sur lequel se forment les spores : les conidies.

On parle de microconidies pour désigner les conidies constituées d'une seule cellule, de macroconidies pour des spores pluricellulaires.

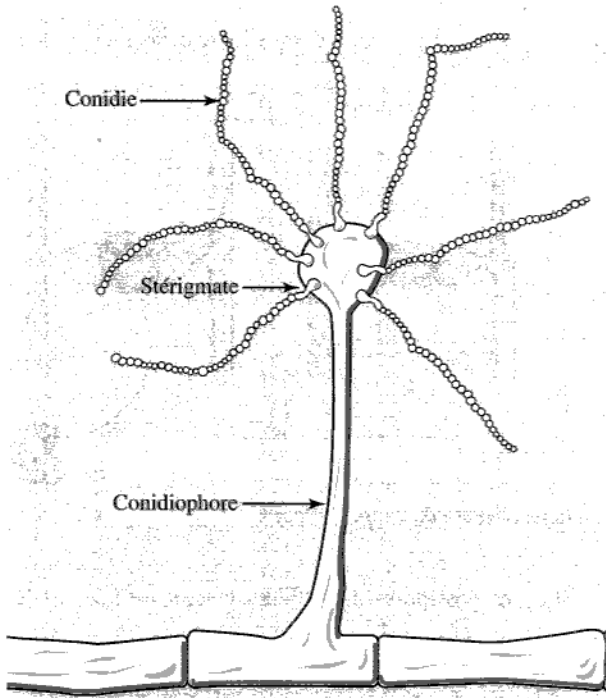
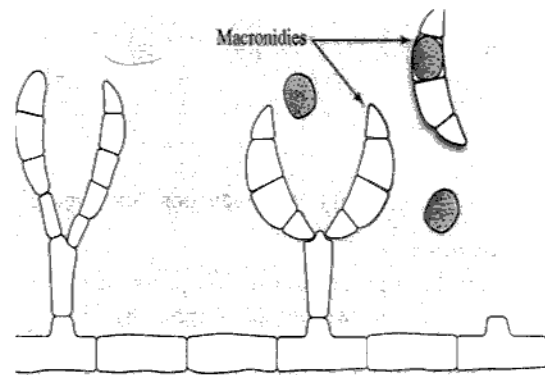


Fig. 10 – Exemple de reproduction asexuée par microconidies : *Aspergillus*

Le conidiophore est une cellule spéciale dans une hyphe, la paroi est plus épaisse, cela permet aux organes de fructification de rester bien séparés du mycélium. Le conidiophore porte des cellules plus différenciées, les stérigmates, supportant des chaînes de spores. Lorsque ces spores sont mûres, elles se détachent du stérigmate.

Fig. 11 – Exemple de reproduction asexuée par macroconidies : *Fusarium*



3 – Des cellules fongiques se multiplient et se différencient pour donner des sporanges dans lesquels se forment des sporangiospores.

Ces dernières sont libérées par l'ouverture du sporange parvenu à maturité.

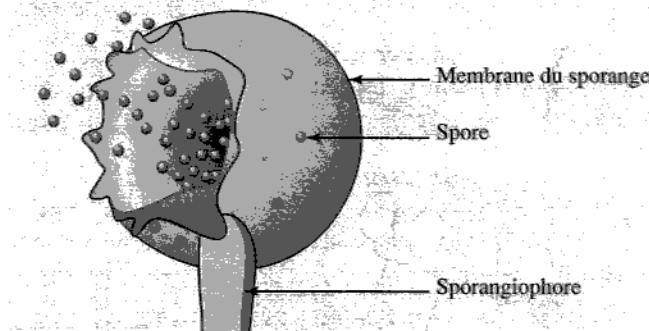


Fig. 12 – Libération des sporangiospores par éclatement du sporange

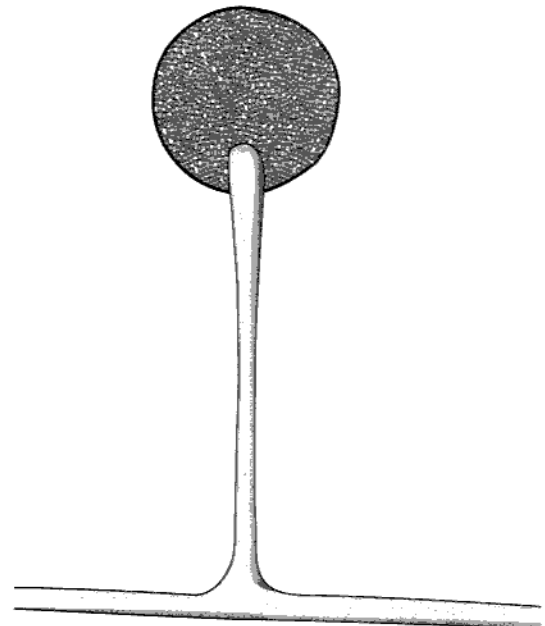


Fig. 13 – Sporange de *Mucorale*

En résumé, les spores de la reproduction asexuée peuvent être produites :

- par la transformation directe d'un filament : arthrospores ;
- à l'extérieur d'un organe spécialisé : conidies ou conidiospores ;
- à l'intérieur d'un organe spécialisé : sporangiospores.

Dans la plupart des cas, elles sont immobiles. Il existe cependant des spores d'origine végétative flagellées, donc mobiles ; elles portent le nom de zoospores.

2.3.2.2. La reproduction sexuée

À partir d'hyphes déjà différenciées, se forment des cellules jouant le rôle de gamètes. Leur fusion équivaut à une fécondation, la cellule qui en résulte subit des transformations plus ou moins importantes pour donner une spore.

On connaît quatre sortes de spores issues de la reproduction sexuée.

1 – Les zygospores (fig. 14)

Deux hyphes voisines produisent des branches latérales ou progamétanges (a) à l'extrémité desquelles se différencient deux gamétanges identiques (b) et (c).

Ceux-ci fusionnent (d) pour donner une cellule dont la maturation aboutit à une zygospore (e) (f).

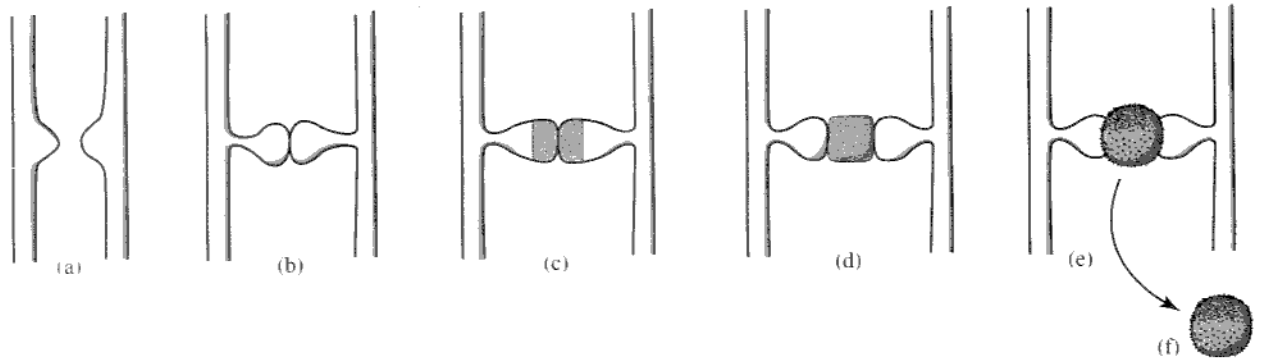


Fig. 14 – Production d'une zygospore chez une moisissure du genre *Rhizopus*

2 – Les oospores

Le mécanisme de la production des oospores est très proche de celui des zygospores. La différence vient du fait que les gamétanges qui fusionnent sont de morphologie différente.

3 – Les ascospores (fig. 15)

Les ascospores ont une origine endogène : elles se forment dans une cellule particulière appelée asque (un asque contient en général un multiple de quatre ascospores).

Les asques sont, eux-mêmes, issus d'hyphes et se forment dans un appareil particulier discoïde (apothécie) ou sphéroïde (périthèce) : ils peuvent être isolés (levures).

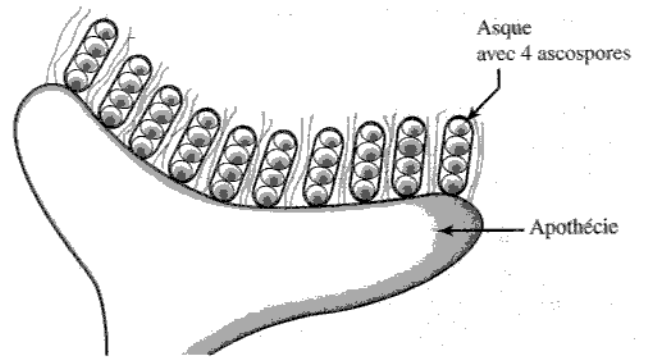


Fig. 15 – Apothécie portant des asques

4 - Les basidiospores (fig. 16)

Comme les ascospores, elles résultent d'une méiose mais elles sont exogènes et portées par une cellule spéciale : la baside.

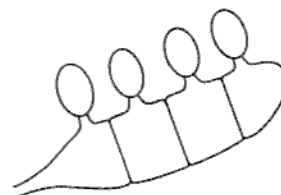


Fig. 16 – Baside portant des basidiospores

2.3.3. Principes de classification

On distingue quatre classes de champignons en fonction de l'aspect des hyphes (cloisonnées ou non, lévuriformes ou non) et du mode de reproduction :

- les Phycomycètes ;
- les Ascomycètes ;
- les Basidiomycètes ;
- *Fungi imperfecti* ou Deutéromycètes.

	Phycomycètes	Ascomycètes	Basidiomycètes	Deutéromycètes
Septum	non	oui	oui	oui
Reproduction	sexuée et asexuée	sexuée et asexuée	sexuée et asexuée	asexuée seulement
Autres caractères distinctifs		thalle le plus souvent lévuriforme présence d'asques	présence de basides	

Tableau 4 – Critères de la classification des champignons

2.3.3.1. principaux groupes de Phycomycètes

Les Phycomycètes comprennent deux sous-classes :

- les **Oomycètes**, caractérisés par la production d'oospores au cours de la reproduction sexuée et de zoospores (spores flagellées) en reproduction asexuée ;
- les **Zygomycètes**, produisant des zygospores. Leur reproduction asexuée est assurée par des conidiospores ou des sporangiospores.

Les **Mucorales** représentent le groupe principal parmi les Zygomycètes au sein desquels ils s'identifient par la production de sporangiospores. Ce groupe comprend les cinq genres très usuels en microbiologie des aliments : *Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*, *Zygorrhynchus* et *Thamnidium*.

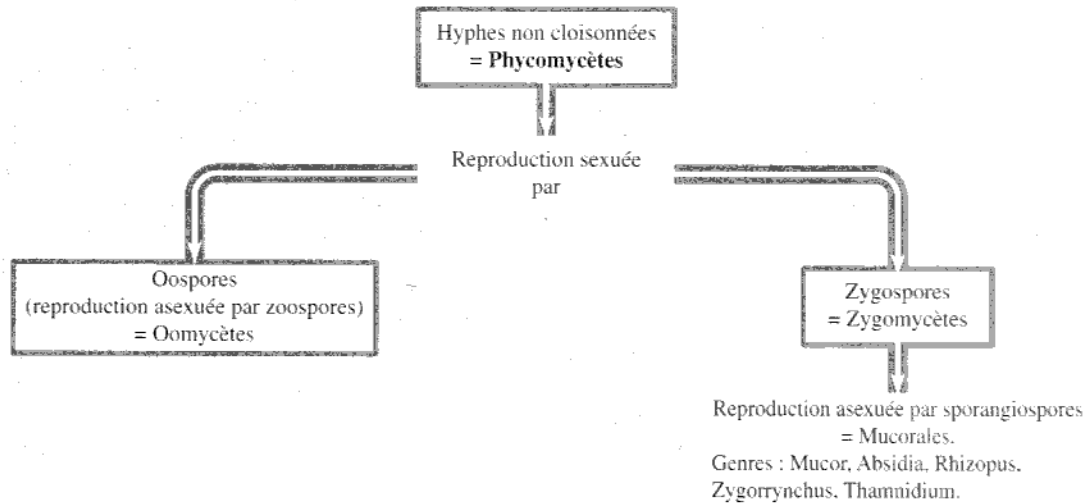


Tableau 5 – Classification des Phycomycètes

2.3.3.2. Les Ascomycètes

Seul l'ordre des Hémiascomycètes intéresse la microbiologie alimentaire. Il rassemble, en effet, les champignons ayant un thalle levuriforme. Les levures constituent un groupe vaste et important qui sera étudié séparément.

2.3.3.3. Les Basidiomycètes

Ce groupe présente peu d'intérêt pour les sciences de l'alimentation, si l'on excepte bien sûr leur intérêt culinaire évident : la plupart des champignons comestibles appartiennent à ce groupe, les autres étant des Ascomycètes.

2.3.3.4. Les Deutéromycètes

Il s'agit d'un groupe très vaste rassemblant toutes les espèces pour lesquelles il n'a pas été observé de reproduction sexuée ou dont la reproduction sexuée est très inconstante.

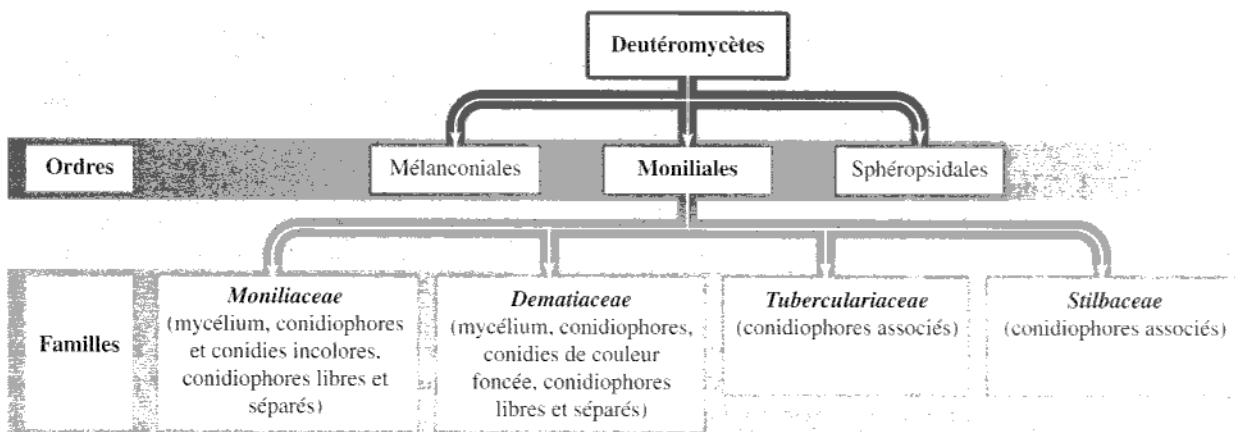


Tableau 6 – Classification des Deutéromycètes

3. Principaux champignons d'intérêt alimentaire

3.1. Les moisissures

Elles ne représentent pas un groupe botanique bien défini. Selon Littré, elles sont « l'altération de la chose moisie ». Nous les définirons comme l'ensemble des champignons microscopiques saprophytes présentant une végétation notable et qui ont de l'importance dans l'industrie humaine.

Elles peuvent être :

- nuisibles, car agents d'altérations d'aliments ;
- utiles, car intervenant dans la production d'aliments, d'antibiotiques, d'enzymes et dans diverses fermentations.

3.1.1. Conditions de développement

À la surface d'un substrat, les spores germent pour produire des hyphes. Les filaments mycéliens s'allongent par leur apex (extrémité), se ramifient plus ou moins pour occuper la surface du support en donnant des colonies circulaires. Ils pénètrent à l'intérieur du substrat en le digérant par des exoenzymes ou par une action mécanique (turgescence). Les nutriments sont absorbés, par osmose et transport actif, sur toute la surface de l'appareil végétatif. Lorsque les nutriments se raréfient, les mycéliums produisent des spores en grand nombre : une orange moisie peut contenir 10^{10} spores. Celles-ci, disséminées par l'air ou par l'eau, redonnent un mycélium lorsque, parvenues sur un nouveau support nutritif, elles retrouvent des conditions favorables.

3.1.1.1. Substrats

Ce sont (comme tous les champignons) des organismes hétérotrophes, se développant donc exclusivement sur des substrats organiques. Ceux-ci sont très diversifiés : produits alimentaires (confitures, fruits, salaisons, grains en silos, produits laitiers...), mais aussi produits manufacturés (bois humide, cuir, papier). Les moisissures jouent un rôle essentiel dans la décomposition de la matière organique, donc dans les cycles de la matière.

Les sources de carbone les plus fréquemment et les plus facilement utilisées sont les glucides. La flore glucidolytique est la flore pionnière dans le sol et dans de nombreuses denrées. Elle s'y développe :

- dans un premier temps, aux dépens d'oses : glucose, xylose, ou de diosides : maltose, saccharose ;
- ultérieurement, à partir des polysides : l'amidon des farines, la lignine, la chitine, la cellulose sont dégradés, par l'action d'enzymes glucidolytiques exocellulaires, en sucres simples qui sont assimilés.

En pratique, il n'existe sans doute pas de polyside naturel qui ne puisse être utilisé par une des nombreuses espèces existantes.

La colonisation d'un substrat naturel (comme un produit alimentaire) est donc, presque toujours, le fait de plusieurs espèces qui s'y succèdent, leur nature et leur ordre d'intervention étant fonction de la nature des substrats disponibles ou rendus disponibles (donc de la composition et des caractéristiques de l'aliment).

Les moisissures sont, selon les espèces, des organismes autotrophes ou hétérotrophes pour l'azote. La plupart utilisent, comme source d'azote, les nitrates ou les sels ammoniacaux mais aussi les acides aminés (présents dans de nombreux aliments à l'état libre). À de rares exceptions près, leurs capacités de protéolyse sont, cependant, limitées.

3.1.1.2. Activité de l'eau

Les spores ne germent pas lorsque la teneur en eau d'un substrat est inférieure à 13 % ou 14 %. Cependant, les exigences et la tolérance vis-à-vis de l'eau sont variables selon les groupes :

- certaines moisissures ne se développent que sur substrat humide, c'est le cas, par exemple, des Mucorales ;
- d'autres peuvent proliférer sur des substrats dont l'humidité est très faible. Ce sont les moisissures xérophiles qui rassemblent les espèces les plus osmophiles. Parmi ces espèces, les mieux adaptées aux substrats secs sont les *Aspergillus* du groupe *glaucus*. Ce sont eux qui, les premiers, colonisent les stocks de grains en silo, préparant le terrain pour d'autres espèces (125 ont été isolées des grains de blé dans les conditions du stockage). Les autres denrées concernées sont les confitures, le lait en poudre, les fruits secs, les farines, les salaisons.

3.1.1.3. Température

La végétation maximale est produite entre 20 °C et 30 °C, mais les moisissures tolèrent généralement de +3 °C à 40 °C.

Certaines espèces sont très résistantes à la chaleur : *Neurospora sitophila*, par exemple, responsable d'altérations du pain, n'est pas détruite par la cuisson. Une vingtaine d'espèces sont capables de continuer à croître à des températures supérieures à 50 °C.

À l'opposé, il existe des moisissures psychrophiles supportant des températures basses et même négatives. Elles peuvent proliférer dans les aliments réfrigérés. Tel est le cas de *Cladosporium herbarum* qui, jusqu'à -6 °C, forme de petites taches noires sur les aliments. *Fusarium tricinctum* se développe encore à -10 °C.

Les spores de moisissures sont détruites par un chauffage à 120 °C pendant vingt à trente minutes en chaleur humide, trois heures à 160 °C en chaleur sèche.

3.1.1.4. pH

Alors que les bactéries affectionnent les milieux neutres ou alcalins, les moisissures se développent mieux en milieu légèrement acide et tolèrent parfois des pH très bas : à pH 1 certains *Penicillium* peuvent encore croître.

3.1.2. Principaux genres et espèces – Intérêt économique

La plupart des moisissures intéressant la microbiologie alimentaire sont soit des Mucorales, soit des Deutéromycètes.

3.1.2.1. Les Mucorales

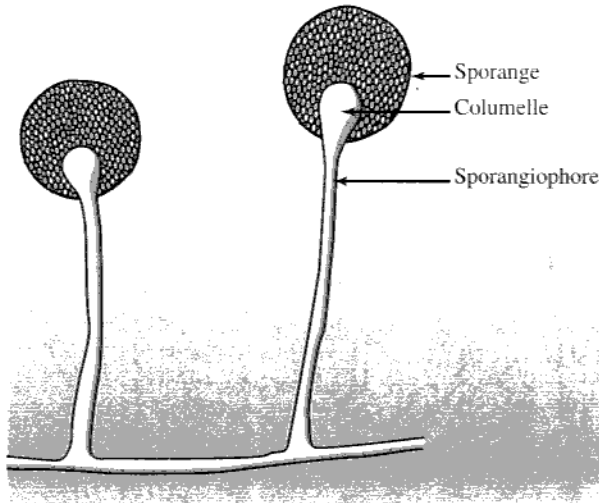


Fig. 17 – Genre Mucor

Les Mucorales du genre Mucor ne possèdent pas de rhizoïdes. La columelle est pseudosphérique. Les ligaments suspenseurs de la zygospore sont identiques.

Les Mucor se développent sur tous les substrats humides mais aussi sur les grains de riz, de blé, de seigle et de maïs.

Mucor rouxii est utilisé dans le processus de saccharification.

Les Mucor sont aussi à l'origine d'accidents de fabrication de certains fromages : les « poils de chat » traduisent leur développement à la surface du fromage.

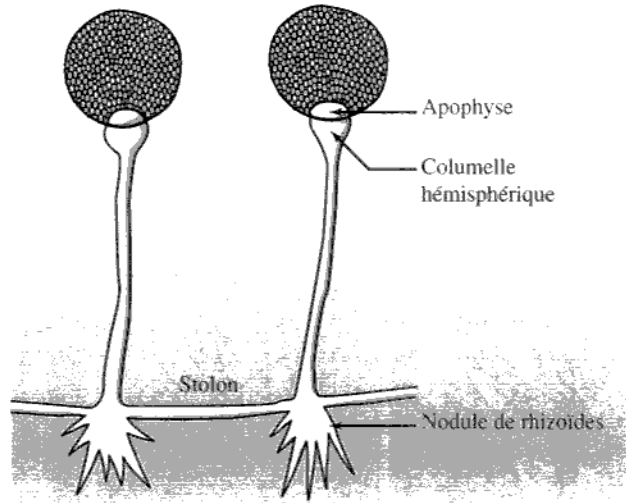


Fig. 18 – Genre Rhizopus

Les moisissures du genre Rhizopus sont caractérisées par la présence de rhizoïdes formant des nodules entre lesquels la portion d'hyphe est appelée stolon. Au niveau de chaque nodule, se forment des sporangiophores portant des sporanges.

À noter que le sporangiophore s'élargit à son extrémité pour produire une columelle hémisphérique, elle-même surmontée d'une apophyse.

L'espèce type est *Rhizopus nigricans*. Elle est souvent à l'origine d'altérations de fruits, légumes et céréales.

Les Rhizopus se développent aussi sur les bananes en stock et sont fréquents sur le pain (moisissure du pain).

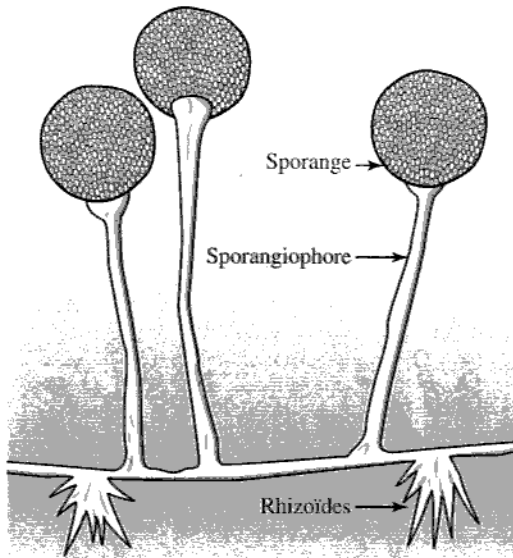


Fig. 19 – Genre Absidia

Les sporanges sont petits. Les sporangiophores sont formés entre les nodules de rhizoïdes. Ces organismes ont le même habitat que les Mucor.

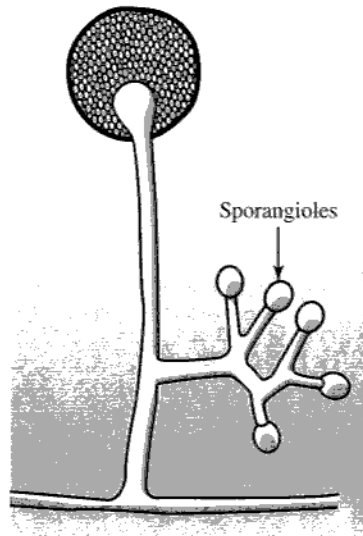


Fig. 20 – Genre Thamnidium

Sa caractéristique principale est la présence de sporangioles à la base du sporangiophore.

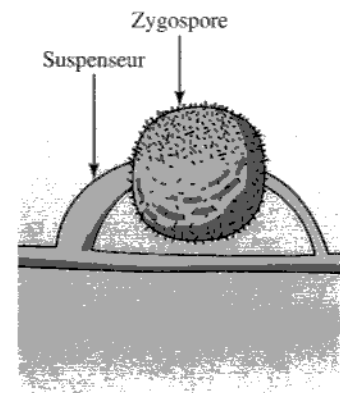


Fig. 21 – Genre Zygorrhynchus

Parmi les Mucorales, les Zygorrhynchus sont les seuls dont les suspenseurs de la zygospore sont de taille inégale.

3.1.2.2. Les Deutéromycètes (*Fungi imperfecti*)

La majorité des souches de Deutéromycètes intéressant la microbiologie alimentaire appartiennent à l'ordre des Moniliales dont la principale caractéristique est de présenter des conidiophores libres.

Nous nous limiterons à la description des genres les plus fréquents.

• Genre *Penicillium*

L'appareil sporifère des *Penicillium* présente une forme comparable à celle d'un pinceau. Il est constitué de conidiophores ramifiés à leurs extrémités en phialides au bout desquelles se rattachent des chaînes de spores. Celles-ci sont, en général, vertes et deviennent brunes à maturité. L'aspect de ces pinceaux permet de classer les *Penicillium* en : monoverticillés, verticillés asymétriques, biverticillés symétriques, asymétriques divariqués, asymétriques non divariqués.

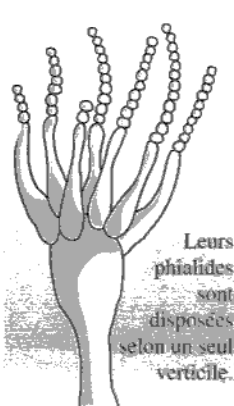


Fig. 22 – *Penicillium* monoverticillé

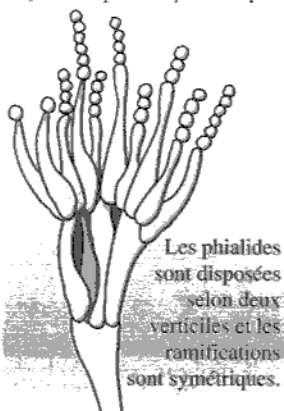


Fig. 23 – *Penicillium* biverticillé symétrique
Exemple : *Penicillium luteum*

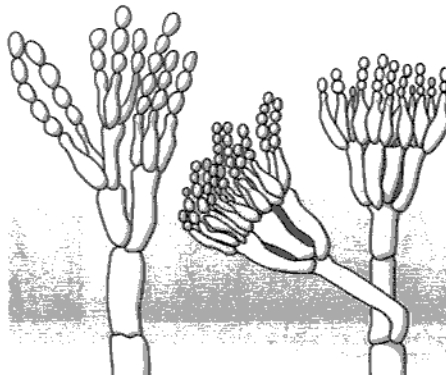


Fig. 24 – *Penicillium* asymétriques divariqués

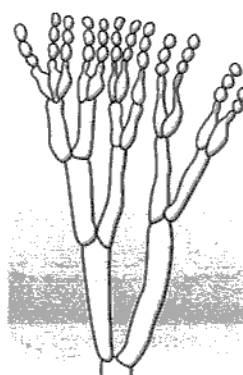


Fig. 25 – *Penicillium* asymétrique non divariqué

C'est dans la catégorie des asymétriques non divariqués que l'on rencontre les souches les plus répandues et les plus utilisées.

Selon l'aspect des colonies, des sous-sections sont distinguées :

- sous-section *velutina* (colonies veloutées). On y trouve *P. chrysogenum* (souche utilisée pour la production industrielle de pénicilline) et *P. roquefortii*;
- sous-section *lanata* (colonies laineuses). Un des principaux représentants en est *P. camembertii*;
- sous-section *funiculosa* (colonies visqueuses, hyphes agrégées en cordelettes);
- sous-section *fasciculata* (colonies granuleuses, conidiophores en faisceaux). Dans ce groupe, figure *Pitalicum* qui est impliqué dans la destruction d'agrumes.

• Genre *Aspergillus*

Le conidiophore est arrondi à son extrémité, il porte des stérigmates sur lesquels sont accrochées les conidies.

Celles-ci forment des chaînes et peuvent être de couleur assez variable selon l'espèce : noires, brunes ou vertes. L'ensemble donne l'aspect en « pomme d'arrosoir », on parle de « tête aspergillaire ».

Sans entrer dans le détail des clés d'identification, nous donnons l'aspect des fructifications des souches les plus communes.

– Unisériés (une couronne de stérigmates)

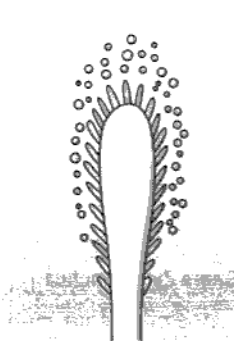


Fig. 26 – *Aspergillus clavatus*
(mycélium bleu-vert)

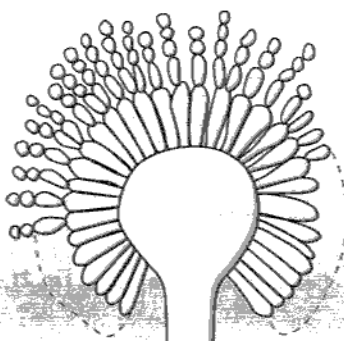


Fig. 27 – *Aspergillus niger*
(mycélium noir) ou
Aspergillus ochraceus
(colonies jaune ocre)

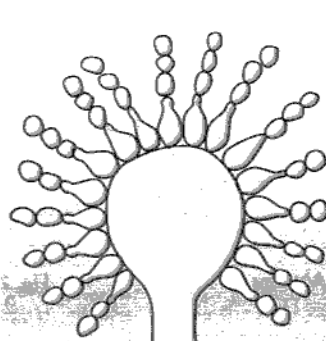


Fig. 28 – *Aspergillus glaucus*
(colonies vert glauque,
périthèces jaunes)

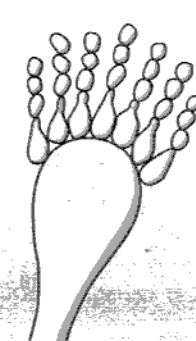


Fig. 29 – *Aspergillus fumigatus*
(colonies gris-vert)

– Bisériés (deux couronnes de stérigmates)

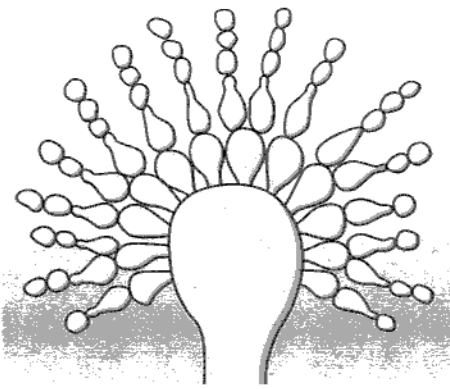


Fig. 30 – *Aspergillus candidus*
(colonies blanches)
ou *Aspergillus versicolor*
(colonies vert-blanc)

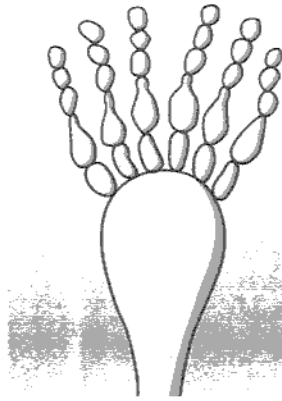


Fig. 31 – *Aspergillus nidulans*
(colonies vert pré)

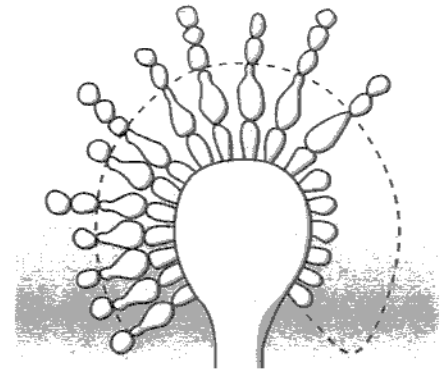
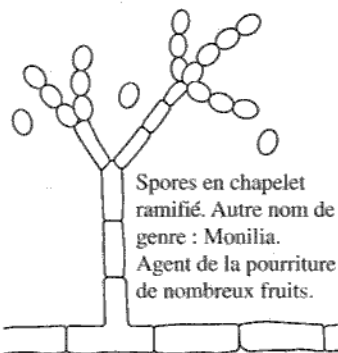


Fig. 32 – *Aspergillus flavus*
(colonies jaune d'or à verdâtre)

Les *Aspergillus* contaminent fréquemment les céréales (blé, riz, orge, maïs...) et leurs dérivés, mais aussi les stocks de fruits et de légumes (bananes, agrumes, pommes...).

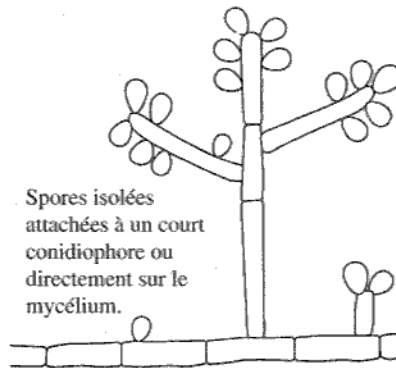
Ils sont tous plus ou moins toxiques, la toxine la plus connue étant l'aflatoxine.

• Autres genres



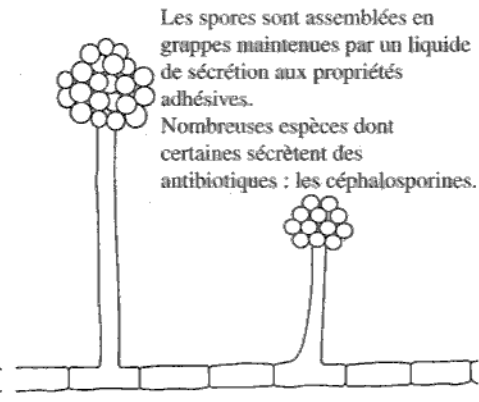
Spores en chapelet ramifié. Autre nom de genre : *Monilia*. Agent de la pourriture de nombreux fruits.

Fig. 33 – Genre *Neurospora*



Spores isolées attachées à un court conidiophore ou directement sur le mycélium.

Fig. 34 – Genre *Sporotrichum*



Les spores sont assemblées en grappes maintenues par un liquide de sécrétion aux propriétés adhésives. Nombreuses espèces dont certaines sécrètent des antibiotiques : les céphalosporines.

Fig. 35 – Genre *Cephalosporium*

Présence de macroconidies fusiformes (macroconidie = conidie pluricellulaire). Les *Fusarium* provoquent des intoxications appelées fusariotoxicoses. Ils produisent, en effet, plusieurs toxines : les trichotécènes et la zéaralénone. Les colonies sont blanches ou légèrement rosées.

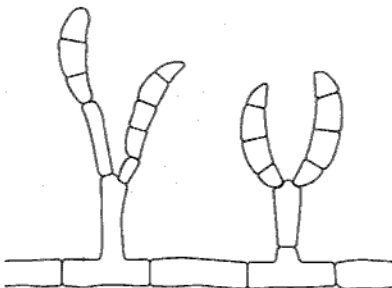


Fig. 36 – Genre *Fusarium*

Présence de macroconidies isolées ou en chaînes, piriformes, vert-brun ou brun foncé. *Alternaria* est à l'origine de l'altération de nombreuses denrées alimentaires, essentiellement d'origine végétale.

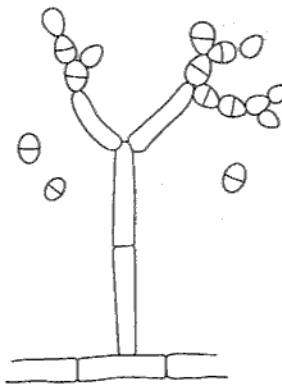


Fig. 37 – Genre *Alternaria*

Les jeunes conidies sont unicellulaires, les conidies âgées sont bicellulaires. *Cladosporium herbarum* donne des colonies noires sur les produits alimentaires.

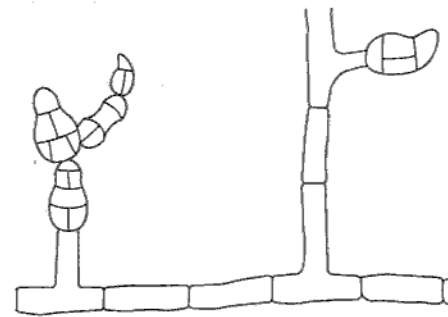


Fig. 38 – Genre *Cladosporium*

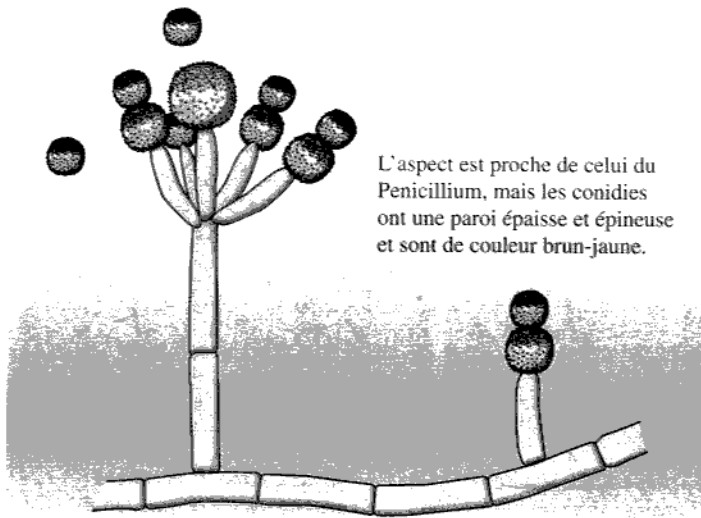


Fig. 39 – Genre *Scopulariopsis*

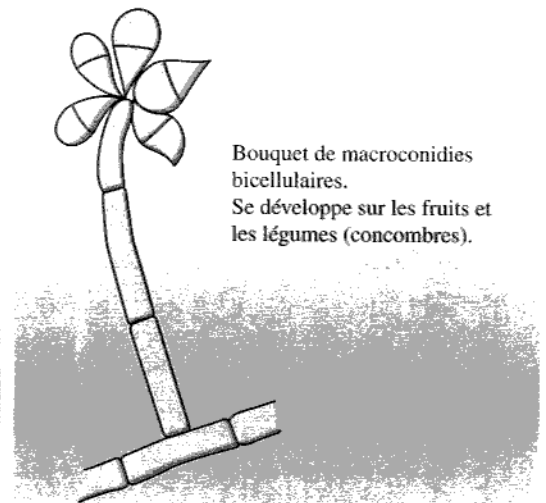


Fig. 40 – Genre *Trichothecium*

3.2. Les levures

On rassemble sous le nom de levures les champignons microscopiques unicellulaires ou qui présentent, au cours de leur développement, une phase unicellulaire.

3.2.1. Morphologie

La forme est généralement sphérique ou ovoïde, mais il existe des aspects plus exceptionnels: triangulaire (*Trigonopsis*), en citron (*Hanseniaspora*). Les cellules se reproduisent classiquement par bourgeonnement, elles peuvent alors se séparer (pas de filaments) ou rester accolées pour donner des filaments appelés pseudomycéliums (*Candida*). D'autres levures (*Trichophyton*) se divisent par scission avec production d'arthrospores. Certaines sont capsulées (*Cryptococcus*, *Torulopsis*).

3.2.2. Conditions de développement

Les levures utilisent fréquemment les glucides qu'elles fermentent. Certaines ont un métabolisme oxydatif qu'elles exercent sur les alcools ou les acides organiques.

Elles sont souvent osmophiles et se développent volontiers sur les préparations concentrées riches en sucres (jus de fruits et laits concentrés, sirops) mais aussi en sel (salaisons).

La température optimale de croissance se situe entre 25 °C et 30 °C, mais les levures tolèrent, selon les espèces, des températures de 35 °C à 47 °C. Elles peuvent s'adapter à tous les pH (sauf les valeurs extrêmes) mais préfèrent les milieux acides.

3.2.3. Intérêt économique

Les levures sont utilisées dans la production d'aliments, pour la vinification, la brasserie, la cidrerie, la distillerie, la panification.

Leur culture de masse permet de produire, avec un bon rendement, des protéines dont la composition en acides aminés est complète et équilibrée.

Les levures sont aussi à l'origine d'altérations d'aliments.

3.2.4. Classification – Principaux genres

On trouve des levures dans les trois grandes classes de champignons septés: Ascomycètes, Basidiomycètes, *Fungi imperfecti*.

3.2.4.1. Levures Ascomycètes

Elles sont identifiées par l'observation d'asques sur des préparations microscopiques réalisées à partir de cultures prélevées sur un ou plusieurs milieux spéciaux. Dans la classe des Ascomycètes, les levures constituent la sous-classe des Hémiascomycètes.

Celles intéressant l'alimentation, appartiennent surtout à la famille des Saccharomycetaceae qui est, elle-même, divisée en quatre sous-familles.

- Les Saccharomycetoideae

Elles se reproduisent par bourgeonnement multipolaire et ne produisent pas de filaments. On y trouve plusieurs genres importants:

- **Saccharomyces**, caractérisés par son métabolisme fermentatif, comprennent des espèces pratiquant la fermentation alcoolique et utilisées en vinification, cidrerie, brasserie, boulangerie;
- **Kluyveromyces**, dont le métabolisme peut être oxydatif. Ce sont les levures du lait;
- **Hansenula** (métabolisme oxydatif), dont les souches contaminent de nombreux aliments.

• Les Endomycetoideae

Ce groupe rassemble les levures Ascomycètes non bourgeonnantes, se reproduisant par scission et production d'arthrospores. Elles peuvent donner un mycélium. Schizosaccharomyces est le genre le plus répandu, il intervient en brasserie et en distillerie.

• Les deux autres familles

Elles sont d'un intérêt secondaire. Elles correspondent à des levures à bourgeonnement bipolaire (Nadsonioideae) ou à bourgeonnement et spores bipolaires (Nematosporideae).

3.2.4.2. Levures Basidiomycètes

Leur incidence au niveau de l'alimentation est assez réduite.

3.2.4.3. Levures sans sexualité

Aucune forme de reproduction sexuée ne peut être mise en évidence sur milieu spécial. Les plus importantes appartiennent à la famille des Cryptococcaceae au sein de laquelle quatre sous-familles sont identifiées.

• Les Cryptococcoideae

Elles regroupent les souches bourgeonnantes, ne donnant ni arthrospores ni pigments. On y trouve des genres très répandus :

- **Candida**, présente des bourgeonnements multilatéraux, peut produire des pseudomycéliums et des mycéliums, certaines espèces donnent des chlamydo-spores (*C. albicans*). *C. lipolytica* est responsable d'altérations du beurre et de la margarine, *C. utilis* est cultivé industriellement pour la production de protéines. *C. albicans* est responsable d'infections humaines;
- **Cryptococcus** est sphérique, ovoïde ou allongé, capsulé; la culture est colorée en jaune ou en rose clair. *C. neoformans* est pathogène pour l'homme;
- **Torulopsis** présente des caractères morphologiques voisins des *Cryptococcus*; il est impliqué dans des altérations de sirops, de jus de fruits et lait concentrés;
- **Brettanomyces** comprend des levures à bourgeonnement multilatéral et souvent disposées en chainettes. Elles sont utilisées en brasserie pour l'arôme qu'elles développent sur extrait de malt.

• Les Rhodotoruloideae

Un seul genre est important : **Rhodotorula**. Ce sont des levures pigmentées à bourgeonnement multilatéral et dont le métabolisme est oxydatif strict. Leur développement sur la viande provoque l'apparition de taches roses.

• Les Trichosporoideae

Elles se reproduisent par scission et production d'arthrospores (genre *Trichosporon*).

• Les Sterigmatomycoideae

Elles présentent peu d'intérêt au niveau des aliments.

4. Diversité du monde bactérien - Anatomie fonctionnelle des bactéries

Sous ce libellé, on intégrera l'étude :

- de la morphologie des bactéries, révélée par les observations au microscope optique;
- de leur structure et de leur organisation interne, aujourd'hui bien connues grâce à l'apport de la microscopie électronique, de la biochimie et de l'immunologie;
- du rôle physiologique des différents constituants;
- de l'intérêt des résultats obtenus pour l'orientation de l'identification bactérienne.

4.1. Formes et groupements

Ils peuvent être appréciés sur une simple préparation à l'état frais, entre lame et lamelle, d'une culture en milieu liquide. Les bactéries présentent des formes très variées, les plus fréquentes étant celles en coques et en bâtonnets.

4.1.1. Bactéries de forme sphérique : coques (cocci)

- Certains se divisent toujours dans le même plan pour former :
 - des **diplocoques**
Parmi ceux-ci citons :
 - les pneumocoques (*Streptococcus pneumoniae*), diplocoques encapsulés, chaque coque ayant la forme d'une flamme de bougie, l'ensemble formant un 8,
 - les *Neisseria*, diplocoques non capsulés aplatis à un pôle;
 - des **chainettes de coques**
Les streptocoques et les leuconostoc apparaissent classiquement ainsi. Certains streptocoques (ceux des groupes B et D), sont, cependant, souvent en diplocoques. Les coques peuvent être plus ou moins ovales.
- D'autres se multiplient dans **deux plans perpendiculaires** et forment des tétrades.
- Avec **trois plans perpendiculaires** de division, on obtient des amas cubiques : ainsi se présentent les sarcines.
- Enfin, les coques admettant de **nombreux plans** de division produisent des amas plus ou moins irréguliers, tel est le cas des staphylocoques.

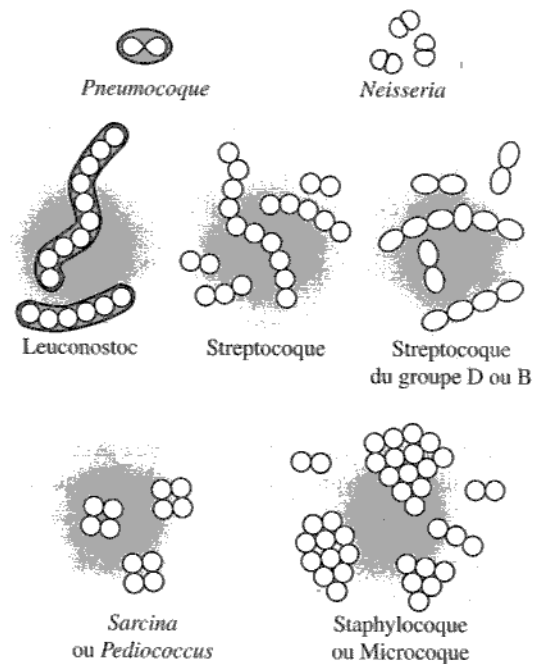


Fig. 41 – Aspect et groupement des principales bactéries de forme sphérique

4.1.2. Bactéries de forme cylindrique : bacilles

Les bacilles peuvent présenter des formes et des arrangements très divers.

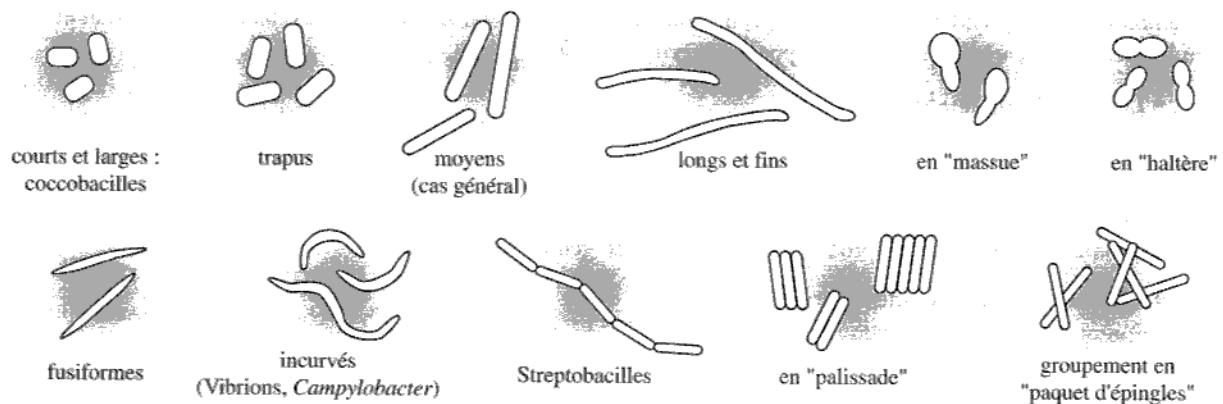


Fig. 42 – Formes et groupement des bacilles

4.1.3. Autres formes existantes

Les bactéries de forme hélicoïdale forment la famille des Spirochetaceae. Il existe des bactéries pédonculées (*Caulobacter*), filamenteuses (*Sphaerotilus*), des formes mycéliennes ramifiées (Actinomycètes).

4.2. Ultrastructure

4.2.1. Vue d'ensemble

L'observation au microscope électronique de coupes ultraminces de bactéries révèle une organisation relativement rudimentaire par rapport aux cellules animales et végétales.

Certains éléments de structure sont présents chez toutes les bactéries, alors que d'autres, facultatifs, n'existent que chez certains groupes bactériens.

- Sont présents chez toutes les bactéries :
 - deux enveloppes :
 - la **paroi**, coque rigide entourant le cytoplasme mais nettement séparée de ce dernier,
 - la **membrane cytoplasmique** qui constitue une enveloppe interne plus mince, plus délicate ;
 - le **cytoplasme**, très homogène, contenant les ribosomes et parfois des granulations de réserve ;
 - l'**appareil nucléaire**, long filament d'ADN, mille fois plus long que la bactérie.
- Peuvent être observés chez certains groupes bactériens :
 - la **capsule**, couche visqueuse entourant complètement la paroi ;
 - les **flagelles**, organites conférant à certaines bactéries leur mobilité ;
 - les **fimbriae**, filaments ténus, très courts, encore appelés « pili communs ». Ils jouent un rôle dans l'adhésion de certaines bactéries aux cellules ;
 - les **pili sexuels**, par lesquels se fait probablement le transfert du matériel génétique d'une bactérie mâle à une bactérie femelle au cours de la conjugaison ;
 - les **spores** qui sont des formes de résistance de certaines bactéries, presque toujours des bacilles à Gram positif.

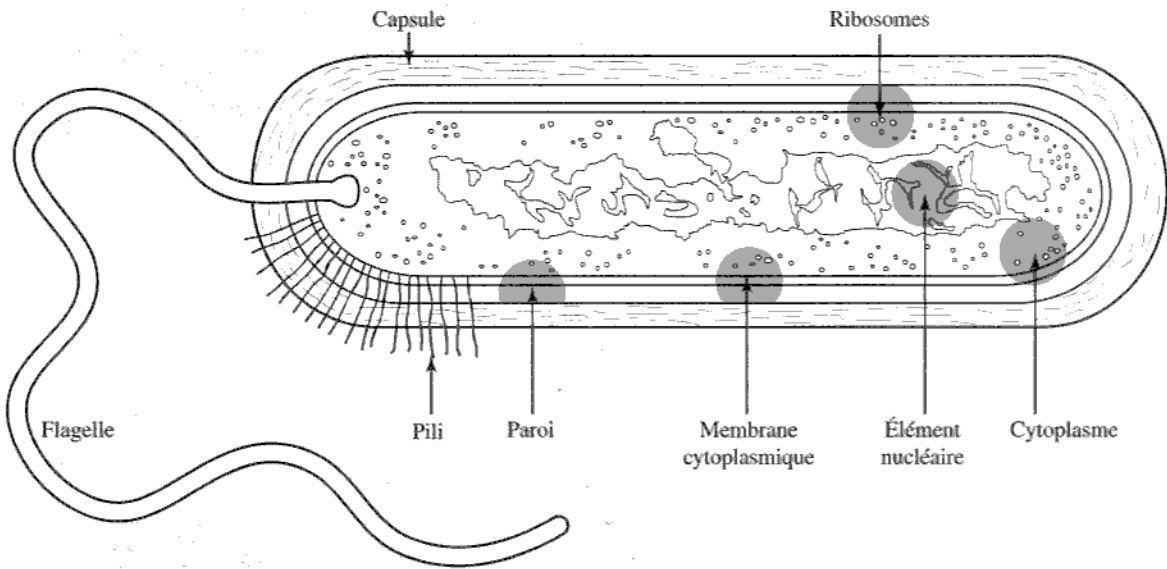


Fig. 43 – Ultrastructure schématisée de la cellule bactérienne (en gris les éléments constants)

4.2.2. Éléments constants de la cellule bactérienne

4.2.2.1. La paroi

On peut assez facilement obtenir des parois isolées en désintégrant des bactéries par l'action des ultrasons, d'enzymes (ribonucléase) et de certains détergents. L'observation en microscopie électronique et l'analyse biochimique de parois de bactéries à Gram positif et à Gram négatif révèlent d'importantes différences d'ultrastructure et de composition chimique. Toutes les parois bactériennes ont, cependant, un constituant commun : le peptidoglycane.

- Le peptidoglycane, constituant commun de la paroi de toutes les bactéries

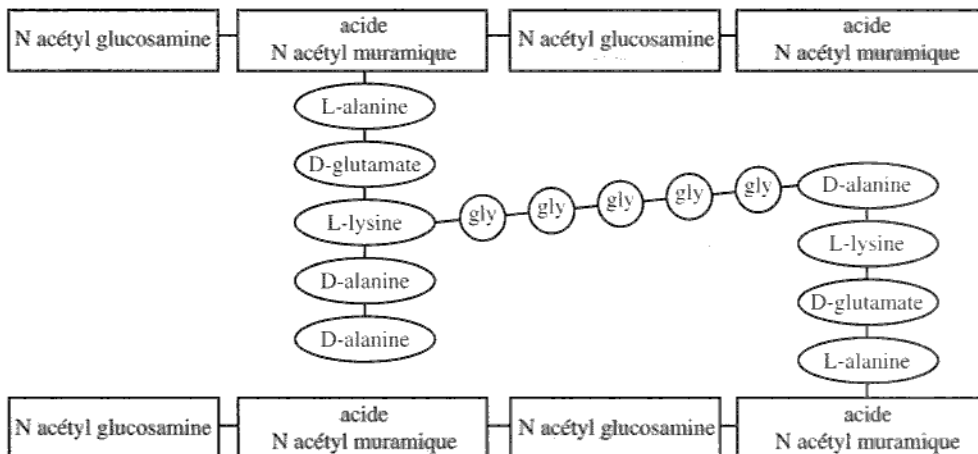


Fig. 44 – Structure schématisée du peptidoglycane de *Staphylococcus aureus*

Le peptidoglycane est une macromolécule comprenant :

- un polyoside de base, polymère de N acétyl glucosamine et d'acide N acétyl muramique ;
- de courtes chaînes peptidiques comportant, en général, quatre acides aminés. Ces tétrapeptides sont branchés sur le polyoside de base au niveau de l'acide N acétyl muramique ;
- des ponts peptidiques (pentaglycine chez *Staphylococcus aureus*) qui relient les tétrapeptides entre deux polyosides de base.

La séquence en acides aminés des tétrapeptides présente quelques variations selon les groupes bactériens. Ce sont eux qui confèrent au peptidoglycane sa cohésion et sa structure en réseau tridimensionnel rigide.

• Organisation de la paroi des bactéries à Gram positif et à Gram négatif

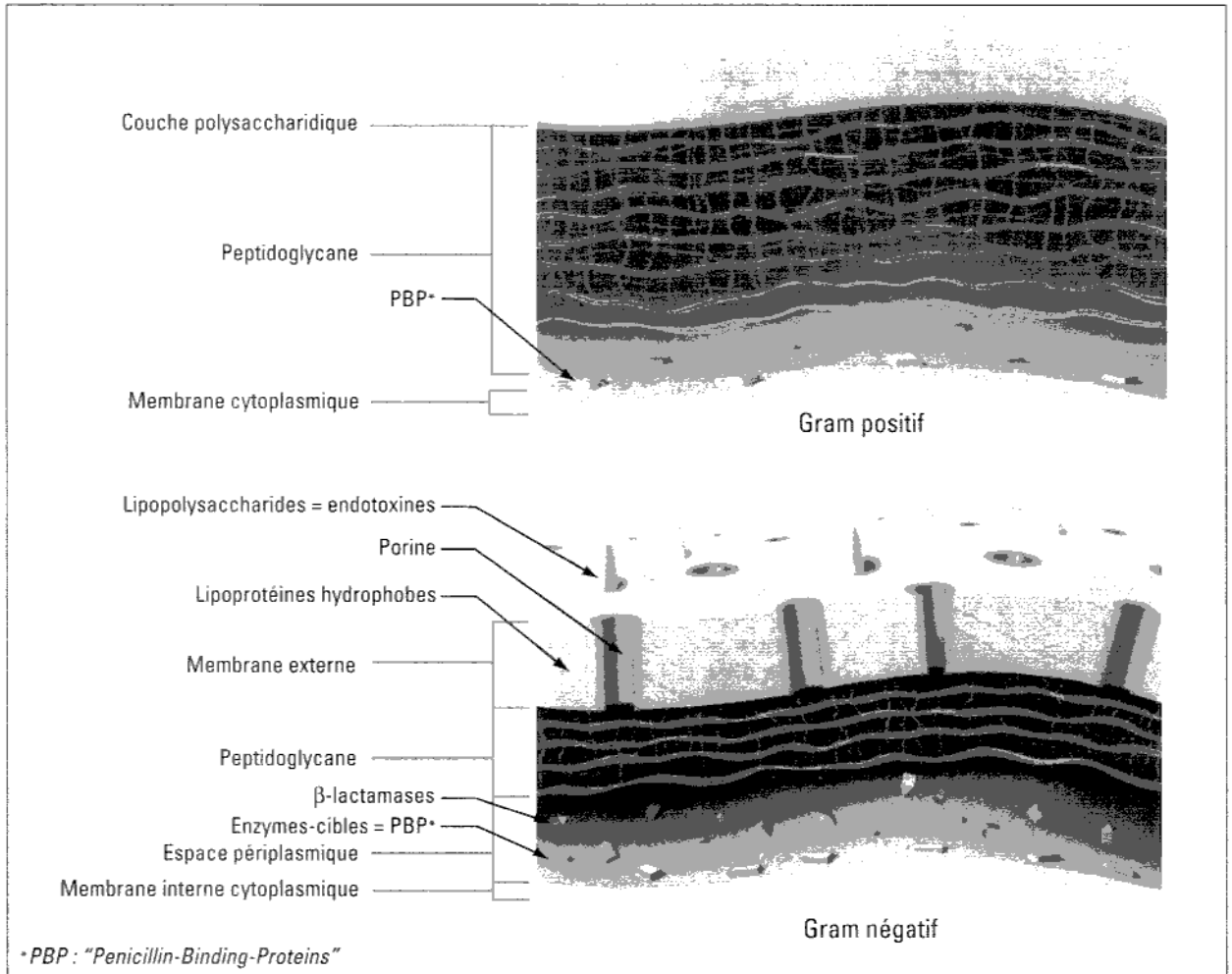


Fig. 45 – Structure comparée de la paroi des bactéries à Gram positif et à Gram négatif

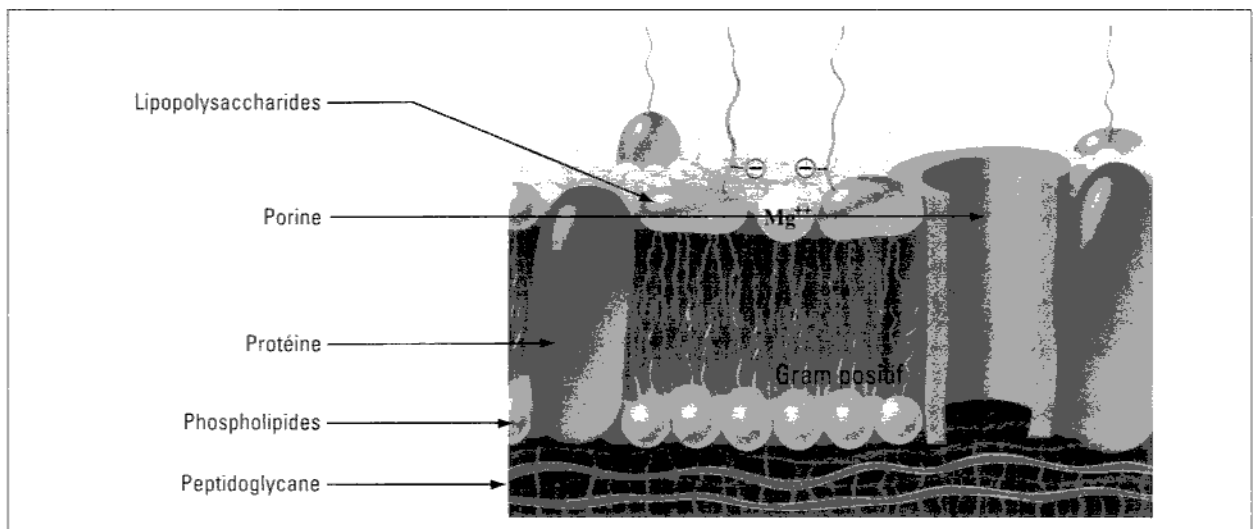


Fig. 46 – Détail de la membrane externe des bactéries à Gram négatif

La paroi des bactéries à Gram positif est constituée en majeure partie de peptidoglycane. Au-delà du peptidoglycane, à la surface de la bactérie, se trouvent d'autres composés de nature polyosidique: acides teichoïques chez les staphylocoques, polyoside C chez les streptocoques, par exemple.

Des protéines de surface jouent un rôle important dans le pouvoir pathogène de certaines espèces: protéine A de *Staphylococcus aureus*, protéines T et M, de *Streptococcus pyogenes* (qui recouvrent le polyoside C).

Les protéines fixant les antibiotiques de la famille des β -lactamines (pénicillines, céphalosporines) sont localisées à la surface de la membrane cytoplasmique.

La caractéristique structurale essentielle de la paroi des bactéries à Gram négatif est la possession d'une membrane externe recouvrant le peptidoglycane.

Elle réunit les constituants suivants:

- des phospholipides organisés en un feuillet bimoléculaire dont l'intérieur, rassemblant les chaînes d'acides gras, constitue une couche hydrophobe;
- des protéines dont certaines forment des canaux traversant le feuillet de phospholipides: ce sont les porines par lesquelles les nutriments hydrophiles de petite taille diffusent au travers de la membrane externe. D'autres protéines jouent un rôle essentiellement structural;
- les lipopolysaccharides (LPS), reliés entre eux par des ions Mg^{2+} , et qui correspondent à l'endotoxine des bacilles à Gram-.

• Fonctions de la paroi

La paroi confère à la bactérie sa forme et sa résistance dans les milieux hypotoniques.

Il est possible de détruire le peptidoglycane par l'action du lysozyme: les bactéries ainsi traitées et placées dans un milieu hypertonique prennent une forme globuleuse.

Ces formations sont appelées protoplastes pour les bactéries à Gram positif et sphéropastes pour celles à Gram négatif. Les protoplastes sont lysés dans un milieu hypotonique.

La paroi est le support d'antigènes.

La paroi contient les sites de fixation des bactériophages, virus parasitant les bactéries.

Le principe des colorations de Gram et de Ziehl repose sur les différences de composition chimique de la paroi des groupes bactériens concernés.

Du fait de sa richesse en lipides, la paroi des bactéries à Gram négatif est plus perméable à l'alcool que celle des bactéries à Gram positif.

La coloration de Gram se déroule en trois temps:

- le frottis, séché et fixé, est recouvert de violet de gentiane ou de cristal violet phénolés. Toutes les bactéries prennent ce colorant. On recouvre alors de réactif de lugol (iode et iodure de potassium) qui joue le rôle de mordant;
- dans un deuxième temps, le frottis est soumis à l'action de l'éthanol de fraction volumique 0,90 à 0,95 (90 à 95° Gay-Lussac). L'éthanol dissolvant le violet de gentiane permet la décoloration de certaines bactéries dites à Gram-. Les bactéries à Gram+ restent violettes;
- après lavage à l'eau, la préparation est recouverte d'un deuxième colorant (safranine ou fuchsine basique phénolées) qui recolor en rose les bactéries précédemment décolorées.

Au terme de ce processus, les bactéries à Gram- apparaissent roses et les bactéries à Gram+ violettes.

Il est possible toutefois de distinguer:

- les Gram+ fortes: les bactéries restent violettes même en cas de décoloration poussée;
- les Gram+ faibles: les bactéries sont violet pâle, voire roses, en cas de décoloration poussée;
- les Gram intermédiaires: des éléments Gram+ et Gram- coexistent (fréquent avec les Neisseriaceae);
- les Gram hétérogènes: le corps bactérien est irrégulièrement coloré (coloration bipolaire de nombreuses entérobactéries, *Pasteurella...*, coloration tigrée de certains *Pseudomonas*).

La coloration de Ziehl

L'importance en pathologie des bacilles tuberculeux et du bacille de la lèpre a conduit à la recherche de colorations particulières.

Elles sont basées sur la capacité de ces bactéries de conserver, après coloration à chaud à la fuchsine, la teinte rose malgré l'action d'un acide fort concentré et de l'éthanol à 0,95.

Cette propriété est en relation avec une constitution particulière de la paroi: elle est très riche en lipides (acides mycoliques, acides gras à longue chaîne et cires) qui ne sont retrouvés que chez ces bactéries dites « alcool-acidorésistantes » ou BAAR.

La coloration de Ziehl consiste à faire agir, à chaud, sur un frottis fixé, de la fuchsine phénolée concentrée (dix minutes), puis à placer la lame successivement dans un bain d'acide nitrique au 1/3 pendant cinq minutes et un bain d'éthanol pendant deux minutes. Après lavage, la lame est recouverte de bleu de méthylène phénolé (cinq minutes).

Les bacilles acido-alcool-résistants (mycobactéries) apparaissent roses sur un fond bleu constitué par le mucus, les cellules et les autres bactéries.

4.2.2.2. La membrane cytoplasmique

- La membrane cytoplasmique est organisée selon le modèle d'une mosaïque fluide de phospholipides et de protéines.

En microscopie électronique, la membrane cytoplasmique apparaît organisée en trois couches : une couche claire aux électrons comprise entre deux couches opaques aux électrons.

Son analyse biochimique montre qu'elle est riche en phospholipides (30 à 40 % de la masse sèche).

Dans la membrane cytoplasmique, les phospholipides sont assemblés de façon comparable à ce qui a déjà été vu pour l'enveloppe externe des bacilles à Gram négatif : les pôles hydrophiles constituent les feuillettes externe et interne de la membrane alors que les chaînes d'acides gras sont regroupées pour former une zone centrale hydrophobe.

Les protéines représentent le constituant majeur des membranes cytoplasmiques : 70 % de la masse sèche. Certaines traversent la membrane de part en part (protéines transmembranaires), d'autres « flottent » dans la masse des phospholipides.

Les glucides, enfin, sont peu représentés (10 % environ). Ils sont associés aux protéines de surfaces (glycoprotéines) et aux phospholipides (glycolipides).

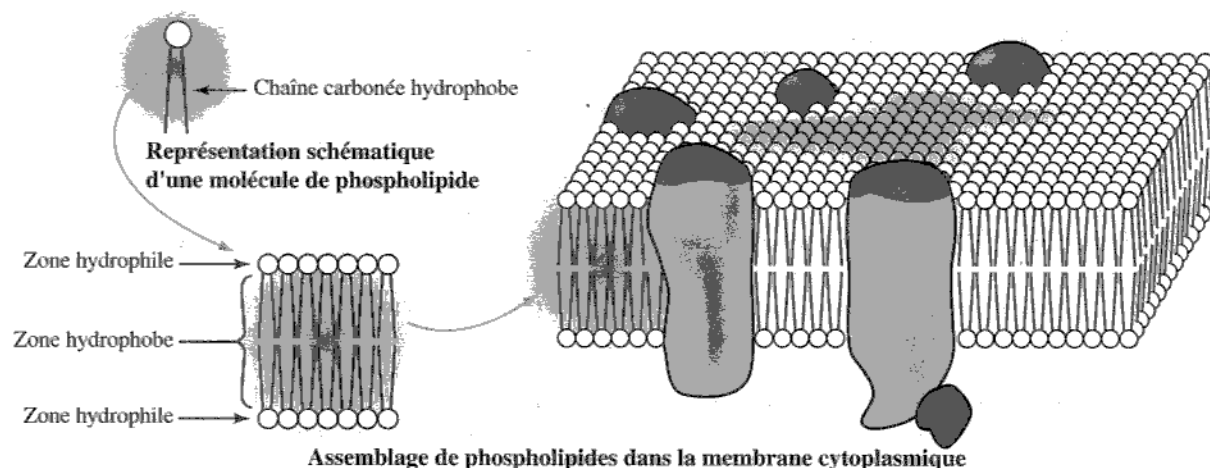


Fig. 47 – La membrane cytoplasmique

- La membrane cytoplasmique contrôle les mouvements de matière entre le cytoplasme bactérien et le milieu extérieur.

Elle empêche la fuite des constituants du cytoplasme (certains acides aminés, glucides ou ions minéraux y sont concentrés jusqu'à 1 000 fois par rapport au milieu extérieur).

Elle assure la pénétration sélective des nutriments :

- par diffusion simple, pour les petites molécules dont la concentration est plus élevée dans le milieu extérieur que dans le cytoplasme ;
- par diffusion facilitée : la substance « voyage » alors au travers de la membrane, liée à une protéine porteuse ;
- par transport actif : certains nutriments essentiels doivent pénétrer dans le cytoplasme contre le gradient osmotique. Ce transport consomme de l'énergie et est catalysé par l'action de perméases. Une perméase est spécifique d'un substrat (acide aminé, ose...) et peut être assimilée à une enzyme catalysant son passage transmembranaire.

- La membrane cytoplasmique est la « centrale thermique » de la bactérie.

À son niveau, se trouvent les enzymes de la respiration cellulaire : les substances organiques y sont oxydées avec production d'ATP.

4.2.2.3. Le cytoplasme

Dépourvu de toute cloison interne, le cytoplasme bactérien est physiquement intermédiaire entre l'état liquide et l'état solide :

- du liquide, il a la fluidité et la viscosité, permettant ainsi les échanges nécessaires à la vie cellulaire ;
- du solide, il possède la résistance et l'élasticité qui permettent l'indépendance physiologique de certaines zones privilégiées.

Cet état, dit d'« hyaloplasme homogène », résulte de l'existence d'un réseau de longues chaînes protéiques, véritable squelette cellulaire enserrant dans ses mailles lipides et protides, le tout en milieu aqueux.

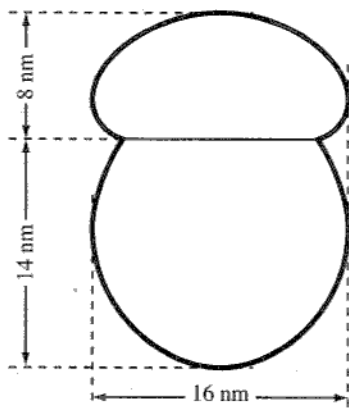
- Le constituant majeur du cytoplasme est l'acide ribonucléique ARN.

En microscopie électronique, le cytoplasme bactérien apparaît granulaire : chaque granulation de 20 nm environ, de forme sphérique ou cylindrique, correspond à des ribonucléoprotéines constituant les ribosomes. Plus une cellule bactérienne est active, plus elle possède de ribosomes : environ 18 000 dans certaines cellules d'*E. coli*.

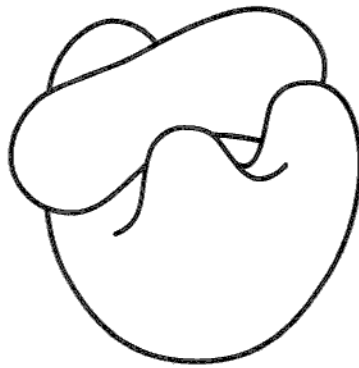
Les ribosomes sont constitués exclusivement d'ARN (63 %) et de protéines.

L'ARN des ribosomes représente près de 90 % de l'ARN total.

Chaque ribosome est constitué de deux sous-unités s'emboîtant selon la figure 48.



Conception classique (d'après J. Alliet)



Modélage selon le schéma de Tischendorf



Fig. 48 – Représentations schématiques du ribosome bactérien

- Le cytoplasme peut contenir d'autres inclusions.

Elles représentent des réserves de différentes substances utiles pour la bactérie :

- glycogène ;
- lipides ;
- métaphosphates (ces granules sont connus sous le nom de granulations métachromatiques) ;
- diverses inclusions minérales : fer chez les sidérobactéries, soufre chez les thiobactéries ;
- des pigments. Chez les bactéries photosynthétiques, les pigments chlorophylliens et caroténoïdes sont localisés dans un organe : le chromatophore ; dans le cas des autres bactéries, ils sont en solution dans les lipides bactériens.

4.2.2.4. L'élément nucléaire

- La présence d'ADN chez les bactéries peut être mise en évidence au microscope optique par des colorations spéciales.

ARN et ADN ont une égale affinité pour les colorants basiques. L'ARN étant très abondant dans le corps bactérien, l'ADN ne peut être révélé par les colorants basiques qu'après destruction des ARN par action d'une ribonucléase.

Il existe aussi une coloration spécifique de l'ADN : la coloration de Feulgen.

Les éléments nucléaires apparaissent ronds chez les coques et allongés chez les bacilles.

- Le noyau bactérien est constitué d'un seul chromosome circulaire.

Ceci peut être démontré par autoradiographie.

Des bactéries sont cultivées en présence de thymidine tritiée (radioactive).

Au cours de leurs divisions, les bactéries intègrent cette base radioactive dans les molécules d'ADN nouvellement synthétisées.

Les bactéries sont alors lysées par un détergent ; la préparation est ensuite dialysée et la membrane de dialyse est recouverte d'une émulsion photographique sensible.

Parmi les images obtenues, certaines permettent d'observer un chromosome circulaire qui peut atteindre la longueur de 1 mm.

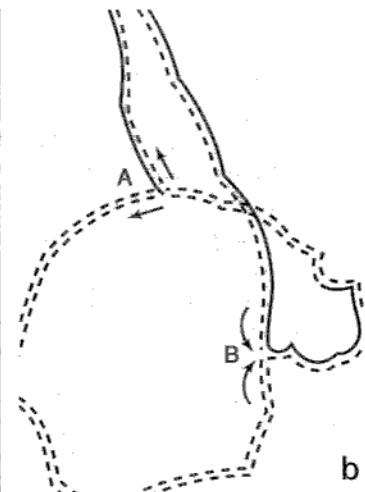
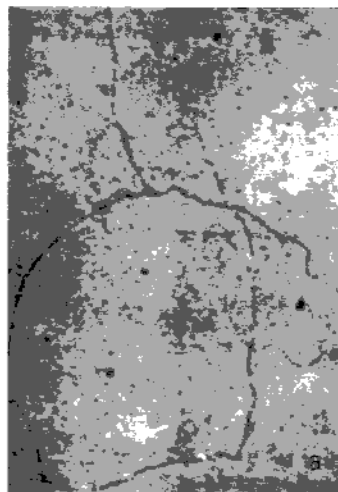


Fig. 49 – Autoradiographie du chromosome d'*Escherichia coli* Hfr-K2 marqué à la thymidine tritiée

a – Autoradiographie au cours de la réplication.

b – Le schéma interprétatif montre : en trait pointillé une double chaîne marquée et en trait plein une seule chaîne marquée. A est le point de départ de la réplication, B est le point de poursuite de la réplication

- L'ADN bactérien est constitué de deux brins complémentaires associés par des liaisons hydrogène.

Il se présente sous la forme d'une double hélice. ⁽¹⁾

L'ADN a été comparé à une échelle dont les montants seraient constitués d'un enchaînement de molécules de désoxyribose phosphate, les barreaux associant deux bases dont la complémentarité se traduit par l'échange de plusieurs liaisons hydrogène. Les bases sont toujours appariées de la même façon : à l'adénine correspond la thymine et à la guanine correspond la cytosine.

Une torsion de cette échelle donne le modèle décrit en double hélice, modèle bien connu depuis les travaux de Watson et Crick.

- L'ADN est le support des gènes qui gouvernent les caractères structuraux et métaboliques de la bactérie.

L'ordre d'enchaînement des bases sur chaque brin d'ADN constitue un code qui gouverne la synthèse des protéines de la bactérie. La synthèse de chaque acide aminé est codée par un triplet de bases. Certains acides aminés possèdent plusieurs codons ; à l'opposé, il existe des codons « non sens ». On connaît la signification de chacune des combinaisons possibles entre les quatre bases ; l'ensemble de ces données constitue le code génétique.

À une séquence donnée de nucléotides sur l'ADN correspond une séquence d'acides aminés, soit un polypeptide, soit une protéine. Ainsi l'ADN est le support du programme selon lequel se déroule la biosynthèse des protéines bactériennes. Ces protéines ont un rôle structural ou une activité enzymatique. Dans ce dernier cas, elles interviennent en catalysant les réactions chimiques du métabolisme : synthèse des autres constituants, catabolismes... C'est donc bien l'ensemble des caractères de la bactérie qui est sous la dépendance de l'ADN.

	U	C	A	G
U	UUU phe UUC phe UUA leu UUG leu	UCU ser UCC ser UCA ser UCG ser	UAU tyr UAC tyr UAA * UAG *	UGU cys UGC cys UGA * UGG try
C	CUU leu CUC leu CUA leu CUG leu	CCU pro CCC pro CCA pro CCG pro	CAU his CAC his CAA glu-N CAG glu-N	CGU arg CGC arg CGA arg CGG arg
A	AUU ileu AUC ileu AUA ileu AUG met	ACU thr ACC thr ACA thr ACG thr	AAU asp-N AAC asp-N AAA lys AAG lys	AGU ser AGC ser AGA arg AGG arg
G	GUU val GUC val GUA val GUG val	GCU ala GCC ala GCA ala GCG ala	GAU asp GAC asp GAA glu GAG glu	GGU gly GGC gly GGA gly GGG glu

Tableau 7 – Le code génétique

Chaque acide aminé est représenté par les trois premières lettres de son nom. * = codon non sens

4.2.3. Les éléments inconstants de la cellule bactérienne

4.2.3.1. Les capsules

Certaines bactéries produisent des substances visqueuses qu'elles accumulent à l'extérieur de leur paroi pour former une couche plus ou moins étendue et plus ou moins dense. Lorsque cette couche est suffisamment dense, on lui donne le nom de capsule.

- Mise en évidence

Plusieurs techniques peuvent être mises en œuvre.

- L'état frais à l'encre de Chine consiste à examiner, entre lame et lamelle, une préparation résultant du mélange d'une goutte de suspension bactérienne avec une petite goutte d'encre de Chine. Le fond de la préparation est noir, la capsule apparaît transparente entourant le (les) corps bactérien(s) plus foncé(s).
- On peut aussi observer des capsules sur un frottis réalisé à partir d'une culture en bouillon sérum (ou d'une suspension faite dans un milieu très albumineux) et coloré par la méthode de Gram. Les capsules apparaissent très nettement sur ces préparations, comme des auréoles claires entourant la bactérie plus intensément colorée, et se dégageant sur le fond rose de la préparation.

- Quelques bactéries capsulées

Les pneumocoques, *Leuconostoc*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, certaines souches d'*Escherichia coli*...

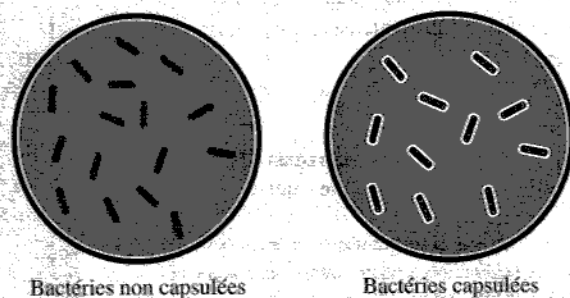


Fig. 50 – Observation des capsules à l'état frais à l'encre de Chine

(1) Voir *Biochimie structurale* de C. AUDIGIE et F. ZONZAIN et *Microbiologie générale* de A. MEYER et H. LECLERC.

- **Nature chimique**

La plupart des capsules bactériennes sont de nature polyosidique. C'est le cas des pneumocoques (acides polyaldobioniques = polymères d'un acide uronique et d'un ose), de *Clostridium perfringens* (polymère de glucose et de rhamnose), de *Klebsiella* ou *Leuconostoc*.

Les *Bacillus* capsulés sont l'exception, leur capsule est de nature polypeptidique.

- **Rôle physiologique**

– La capsule est l'antigène le plus superficiel de la bactérie.

C'est le support de la classification de différentes espèces en sérotypes.

– La capsule est un des éléments du pouvoir pathogène.

L'inoculation à la souris de pneumocoques capsulés provoque la mort de l'animal en 24 à 48 heures. À l'autopsie, des pneumocoques peuvent être observés dans le sang et de nombreux organes, sur de simples frottis colorés.

La même expérience réalisée avec des pneumocoques non capsulés n'entraîne aucune infection chez la souris.

Par ailleurs, des expériences *in vitro* ont montré que :

- les pneumocoques capsulés échappent à la phagocytose ;
- les pneumocoques non capsulés sont facilement phagocytés ;
- des pneumocoques capsulés mis en présence d'anticorps antipolyosidiques capsulaires du même type sont phagocytés ;
- des pneumocoques capsulés mis en présence d'anticorps antipolyosidiques capsulaires d'un type différent résistent à la phagocytose.

La capsule possède en effet des propriétés antiphagocytaires qui sont annulées lorsqu'elle est recouverte d'anticorps spécifiques.

La possession d'une capsule confère aux bactéries la propriété de produire des colonies d'aspect différent.

Les bacilles à Gram- capsulés : *Klebsiella*, *Escherichia coli* du groupe antigénique A, forment de grosses colonies grasses et muqueuses dites « en coulée de miel » (tendance à la confluence).

Les pneumocoques capsulés donnent de petites colonies de type « S » : rondes, lisses, bombées, à bord régulier, tandis que les pneumocoques non capsulés forment des colonies « R » : plates, rugueuses, ridées, à bord irrégulier.

4.2.3.2. Les flagelles

- **Structure**

Ce sont des organites longs de 10 à 20 µm (plusieurs fois la taille de la bactérie), flexibles et sinueux. Ils s'insèrent sous la membrane cytoplasmique par un corpuscule basal constitué de deux anneaux protéiques : le plus interne est solidaire de la membrane, le plus externe est situé au niveau de la paroi. Les flagelles sont constitués de chaînes polypeptidiques enroulées en hélice à la manière des fibres torsadées d'une corde. Leur constituant principal est une protéine de PM 41 000 : la flagelline.

- **Mise en évidence**

Les flagelles, trop fins, ne sont pas visibles sans artifice au microscope optique. Pour les visualiser, on doit les traiter, après mordantage, par un colloïde qui les épaissit. Sur ce principe, sont basées les colorations de Rhodes et de Leifson.

Les colorations de cils ainsi que les observations au microscope électronique permettent de mettre en évidence plusieurs types de ciliatures.

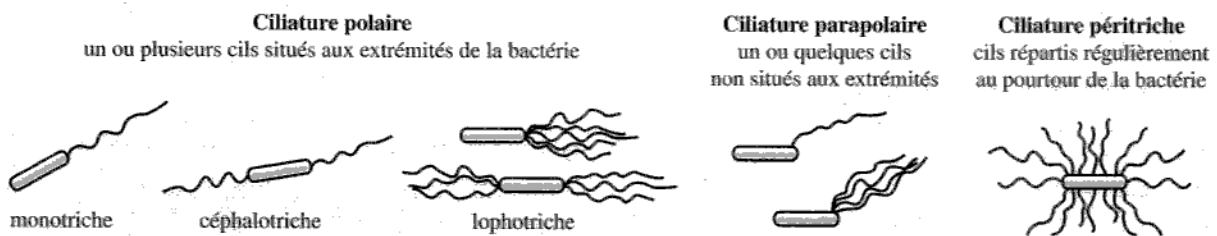


Fig. 51 – Les différents types de ciliature

Le type de ciliature est un des critères d'identification des bacilles à Gram-. Ainsi, les entérobactéries mobiles le sont par une ciliature péritriche. Les *Pseudomonas* et les vibrions ont une ciliature polaire.

L'examen à l'état frais permet de prévoir certains types de ciliatures. Les bactéries possédant une ciliature péritriche ont une mobilité « hésitante », changent fréquemment de direction pour parfois revenir à leur point de départ. Celles dont la ciliature est polaire se déplacent rapidement avec un trajet sensiblement rectiligne.

• Rôle physiologique

– Les flagelles sont les organes locomoteurs de la bactérie.

Il est probable que, au cours d'un déplacement, les flagelles subissent un mouvement de rotation autour de leur axe et fonctionnent à la manière d'une hélice.

L'anneau le plus basal, fixe, joue le rôle de stator, tandis que l'anneau supérieur, mobile, comparable à un rotor, entraîne dans son mouvement le reste du flagelle.

– Les flagelles portent des antigènes.

Ils sont le support des antigènes « H » des bacilles à Gram négatif. Il y a autant d'antigènes H que de flagellines de compositions différentes. L'étude des antigènes H est un élément important de la détermination du séovar d'une *Salmonella*.

4.2.3.3. Les pili

Ces formations filamenteuses, distinctes des flagelles, s'observent chez de nombreuses bactéries Gram-. Il existe différents types de pili.

• Les pili communs (synonyme = fimbriae)

Très courts (< 1 µm) et rigides, ils sont nombreux : cent à deux cents par bactérie. Ils possèdent un canal axial très net.

De nature protéique, ils sont antigéniques et porteurs de propriétés hémagglutinantes.

Ils jouent un rôle important dans l'adhésion des bactéries aux membranes cellulaires et constituent un des éléments du pouvoir invasif des bactéries.

• Les pili sexuels

Plus longs (20 µm) et souples, terminés par une sorte de bouton, ils sont peu nombreux : un à quatre par bactérie. Les plus connus sont les pili F, véritables organes sexuels de bactéries mâles Hfr ; ils permettent la reproduction sexuée (conjugaison) ainsi que les échanges plasmides qui joueront un rôle primordial dans l'acquisition de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

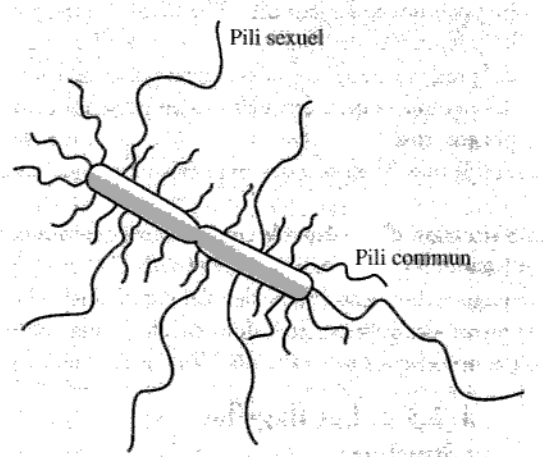


Fig. 52 – Les deux types de pili

4.2.3.4. Les spores

• Conditions d'observation au microscope optique

Il existe des colorations spéciales :

- au vert malachite à chaud (la fuchsine étant utilisée ensuite comme colorant de contraste), les spores apparaissent vertes sur fond rose ;
- à la fuchsine à chaud (technique de Moeller) avec le bleu de méthylène comme colorant de contraste, les spores apparaissent roses sur fond bleu.

Les spores sont cependant bien visibles à l'examen à l'état frais sur lequel elles forment un espace clair, brillant, réfringent, sphérique ou ovoïde, ainsi qu'à la coloration de Gram : la spore y est incolore ou légèrement rose incluse dans un bacille en général violet.

• Différents types de spores

On ne trouve guère de spores que chez certains bacilles à Gram positif, en particulier les bactéries des genres *Bacillus* et *Clostridium*.

Selon l'aspect et la position de la spore, on distingue :

- des spores déformantes dont le diamètre est supérieur à celui de la bactérie ;
- des spores non déformantes dont le diamètre est inférieur au diamètre cellulaire.

Pour chaque catégorie, les spores peuvent être centrales, terminales ou subterminales.

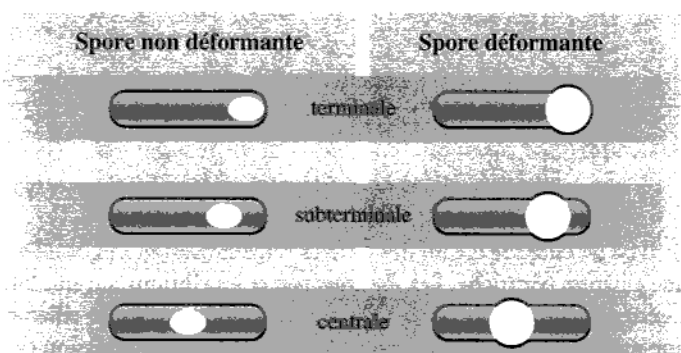


Fig. 53 – Les différentes catégories de spores

• Ultrastructure des spores

Elle peut être décrite à partir d'électronographies.

De l'intérieur vers l'extérieur, on trouve :

- le protoplasme contenant l'appareil nucléaire et le cytoplasme très réduit;
- une membrane fine appelée paroi sporale;
- le cortex, de structure stratifiée;
- la tunique;
- l'exosporium.

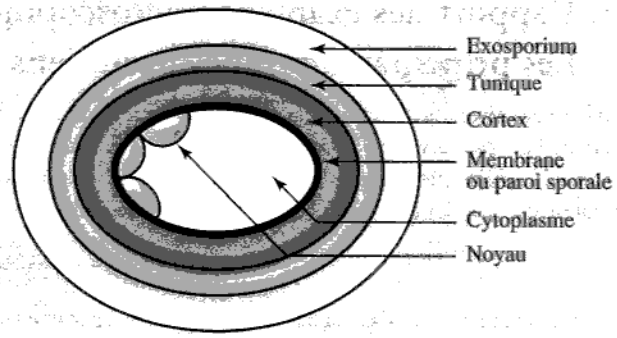


Fig. 54 – Schéma de la structure de la spore chez les *Bacillus*

• Rôle physiologique

- La spore est une forme de résistance :

la sporulation se déclenche lorsque les conditions de vie sont défavorables ou hostiles : vieillissement, appauvrissement en nutriment...

Les étapes de la sporulation sont schématisées figure 55.

- La spore assure la survie de la bactérie.

Elle résiste :

- au vieillissement : les spores peuvent conserver leurs capacités de germination plusieurs dizaines d'années après leur formation ;
- à la chaleur : toutes les spores survivent à un chauffage prolongé à 100 °C (tableau 8) ;
- au froid : elles sont conservées au cours d'une congélation ou d'une lyophilisation ;
- aux agents physiques : dessiccation, rayons X, ultraviolets ;
- à de nombreux agents chimiques : antiseptiques, antibiotiques.

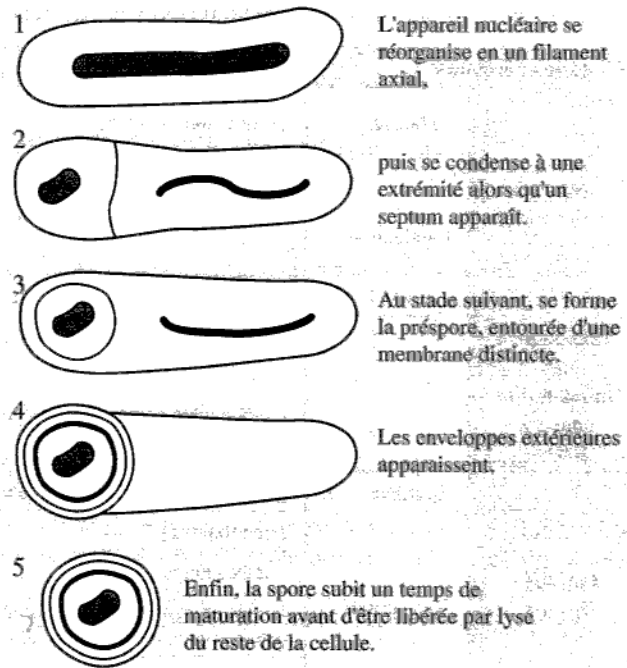


Fig. 55 – Les cinq étapes de la sporulation

	Chaleur humide	Chaleur sèche
<i>Bacillus anthracis</i>	5 minutes à 120 °C	2 h à 120 °C ou 10 minutes à 180 °C
<i>Clostridium perfringens</i>	5 minutes à 120 °C	50 min à 120 °C ou 5 minutes à 180 °C
<i>Clostridium tetani</i>	10 minutes à 120 °C	30 min à 120 °C ou 1 minute à 180 °C
<i>Clostridium botulinum</i>	20 minutes à 120 °C	2 h à 120 °C ou 10 minutes à 180 °C

Tableau 8 – Conditions de chauffage nécessaires pour détruire les spores de quelques espèces productrices

• Germination des spores

Quand les conditions redeviennent favorables, la spore se réhydrate, reprend une activité métabolique pour redonner une forme végétative : les enveloppes éclatent, la jeune cellule est libérée.

La présence de spores dans un aliment est donc une des principales entraves à sa conservation. Celle-ci pourra être obtenue soit par un traitement (en général chauffage) permettant de les détruire (stérilisation), soit en créant des conditions inhibant leur germination (par exemple, un milieu suffisamment acide, l'addition de nitrates ou de nitrites, certains conservateurs contribuent à inhiber la germination des spores de *Clostridium botulinum*).

4.3. L'apport des examens microscopiques à l'identification – Les principaux groupes bactériens

Sur la base des résultats de l'étude des caractères microscopiques, il est possible de faire une première orientation du diagnostic bactérien. Les résultats sont, cependant, plus précis et plus fiables si l'on inclut dans les clés d'identification ceux de deux caractères biochimiques simples et de réalisation aisée : la possession d'une catalase et celle d'une oxydase.

La catalase est une des enzymes catalysant la décomposition de l'eau oxygénée en oxygène et eau.



On recherche sa présence dans la bactérie en déposant, sur une lame, une parcelle de culture dans une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes. Si la bactérie testée possède une catalase, on observe la formation de bulles d'oxygène.

On appelle oxydase une enzyme catalysant l'oxydation d'un substrat incolore (l'oxalate de tétraméthylparaphénylène-diamine) en un composé de couleur violacée. Pour rechercher cette enzyme, on dépose une parcelle de culture sur un disque de papier imprégné du réactif et placé sur une lame. Si la bactérie testée possède une oxydase, on observe, au niveau du dépôt, le développement d'une teinte violette virant assez rapidement au noir.

Bactéries aérobies			
Coques à Gram+	Catalase +	groupement en amas	<i>Micrococcus</i> <i>Staphylococcus</i>
	Catalase –	groupement par deux ou en chaînettes	<i>Streptococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Leuconostoc</i>
		groupement en amas cubiques ou en tétrades	<i>Pediococcus</i>
Diplocoques ou Diplobacilles courts à Gram–		diplocoques à Gram– aplatis à un pôle	Genre <i>Neisseria</i>
		diplobacilles courts à Gram– ou variable	Genres <i>Moraxella</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Kingella</i>
Bacilles à Gram+	Sporulés	gros, à bords parallèles, extrémités à angles vifs	<i>Bacillus</i>
	Non sporulés	coccobacilles	<i>Listeria</i>
		bacilles longs	<i>Lactobacillus</i>
		bacilles moyens, en haltères ou en massues, groupements en palissade ou en lettres	<i>Corynebacterium</i>
		bacilles longs et fins	<i>Erysipelothrix</i>
Bacilles à Gram– cultivant sur milieux ordinaires	Oxydase–	bacilles polymorphes	Entérobactéries
		bacilles non polymorphes	<i>Stenotrophomonas (Xanthomonas)</i>
	Oxydase+	bacilles droits	<i>Pseudomonas</i> et genres apparentés (<i>Flavobacterium</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Burkholderia</i>)
		bacilles incurvés	Vibrions et apparentés (<i>Aeromonas</i>)
Bactéries anaérobies strictes			
Bacilles à Gram+	Sporulés	gros bacilles	<i>Clostridium</i>
Bactéries Gram divers	Non sporulées	formes diverses	Flore de Veillon

Tableau 9 – Classement des principaux groupes bactériens en fonction de leurs caractères microscopiques et de la production d'une oxydase ou d'une catalase

CHAPITRE II

PHYSIOLOGIE BACTÉRIENNE

1. Nutrition – Notion de milieu de culture

Lorsqu'on introduit un petit nombre de bactéries dans un milieu liquide neuf, ce dernier, s'il est placé dans de bonnes conditions d'incubation, se trouble en quelques heures. Un dénombrement microbien montrerait que se sont formées des milliards de bactéries identiques.

Une cellule bactérienne se multiplie, en effet, toutes les vingt minutes (dans le cas d'*Escherichia coli*), parfois moins. Si rien ne devait arrêter cette prolifération, la descendance atteindrait en 48 heures une masse égale à 4 000 fois celle de la Terre! Une bactérie peut donc être comparée à une usine à haut rendement et forte productivité dont le produit de l'activité est sa matière vivante. Celle-ci est de composition complexe.

Comme toute cellule, la bactérie est constituée (voir chap. 1):

- d'un nombre important de petites molécules telles que les acides aminés, les oses, les acides organiques, les ions minéraux, constituant un « pool » cytoplasmique, sorte de réserve de matériaux disponibles pour les synthèses ;
- d'un nombre plus restreint (mais quantitativement prépondérant) de molécules de polymères : protéines, polysides, lipides, lipopolyosides, acides nucléiques, résultant de l'assemblage des petites molécules et représentant les véritables « molécules de la vie ».

Au total, on a pu recenser chez *Escherichia coli*, 5 000 composants différents dont 1 000 protéines (pour la plupart des enzymes).

Composants	% poids sec	Nombre de molécules par cellule	Nombre de molécules différentes
Protéines	55	$2,36 \cdot 10^9$	1050
ARN	20,5	$6,4 \cdot 10^4$	463
ADN	3,1	2	1
Lipides	9,1	$2,2 \cdot 10^7$	4 (nombreuses variétés)
Lipopolyosides	3,4	$1,2 \cdot 10^6$	1
Peptidoglycane	2,5	1	1
Glycogène	2,5	4300	1
TOTAL polymères	96,1		
Substances organiques solubles = « pool cytoplasmique »	2,9	$3 \cdot 10^8$	900
Ions minéraux	1,0	$2 \cdot 10^8$	20

Tableau 1 – Composition chimique d'*Escherichia coli*

Par le calcul, on obtient des estimations quelque peu différentes : le poids moléculaire d'un ADN d'*Escherichia coli* est de $2,5 \cdot 10^9$, compte tenu du fait que trois nucléotides codent pour un acide aminé, un ADN peut donc commander la synthèse de 3 000 à 4 500 protéines différentes de taille moyenne.

Il est probable que tous les constituants d'*Escherichia coli* ne sont pas connus, d'autre part toutes les possibilités théoriques de synthèse ne sont pas utilisées, du fait de l'existence d'ADN non codant.

1.1. Notion de nutriment et de milieu minimum

La plupart des substances organiques du pool cytoplasmique sont des constituants de polymères en attente d'intégration. Les bactéries peuvent les obtenir de deux façons:

- en les prélevant directement dans leur environnement (si ce dernier les fournit);
- en les synthétisant à partir d'autres nutriments (fig. 1).

D'autre part, la synthèse de la matière vivante, comme toute synthèse, consomme de l'énergie. Étudier la nutrition des bactéries revient donc aussi à poser le problème de la source d'énergie.

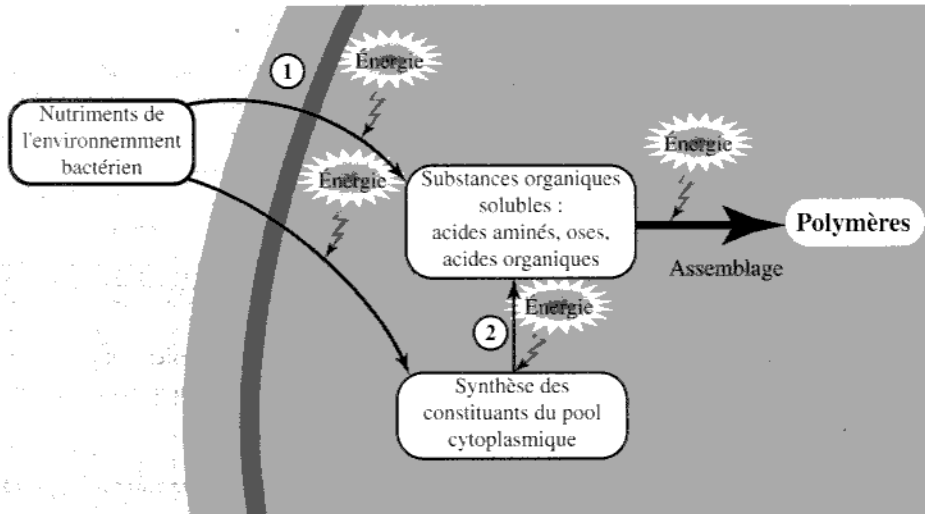


Fig. 1 – Utilisation des nutriments

On définit donc comme nutriment, une substance que la bactérie puise dans son environnement et est capable d'utiliser avec (voie ②) ou sans (voie ①) transformation pour produire ses constituants.

Parmi les nutriments apportés par un milieu de culture, certains sont indispensables: s'ils ne sont pas fournis, la bactérie ne peut se développer.

Un **milieu minimum** est un milieu de culture n'apportant que les nutriments indispensables. Sa composition varie considérablement selon la nature de la bactérie. Un milieu minimum sera d'autant plus complexe que les capacités biosynthétiques sont réduites (ce que la voie ② ne pourra fournir, la voie ① devra l'apporter).

1.2. Besoins élémentaires

« Rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme ».

Une bactérie devra puiser dans son environnement, en qualité et en quantité, tous les éléments chimiques dont elle est constituée.

L'analyse élémentaire des constituants bactériens donne des résultats très voisins de ceux obtenus pour une cellule eucaryote.

Six éléments sont retrouvés en quantités importantes (macro-éléments): C, H, O, N, P et S. De nombreux autres éléments sont présents en quantités plus faibles: K, Na, Mg, Cl, Fe, Mn... D'autres, enfin, n'existent qu'à l'état de traces, ce sont les oligoéléments: Al, Zn, Co, Cu, Va, Mo...

Éléments	Pourcentage en masse sèche
Carbone	50
Oxygène	20
Azote	14
Hydrogène	8
Phosphore	3
Soufre	1
Potassium	1
Sodium	1
Calcium	0,5
Magnésium	0,5
Chlore	0,5
Fer	0,2
Divers	0,3

Document 1 – Composition élémentaire d'une cellule bactérienne (*E. coli*)

1.3. La couverture des besoins élémentaires non carbonés

Une solution saline de composition adéquate suffit, dans la plupart des cas, pour couvrir les besoins en éléments non carbonés.

En voici un exemple:

PO ₄ HK	10,5g
PO ₄ H ₂ K	3,5g
Cl NH ₄	0,5g
SO ₄ Mg, 7H ₂ O	0,05g
SO ₄ Fe, 7H ₂ O	0,005g
NaCl, 2H ₂ O	0,05g
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,005g
Eau distillée	1 litre

Document 2 – Besoins élémentaires non carbonés

Cette base minérale fournit en quantité suffisante: N, P, S, Ca, Mg, K, Cl, Fe et Mn. H et O sont apportés par l'eau et les différents sels. Les oligoéléments sont présents en quantité suffisante dans les impuretés des réactifs, du verre, des récipients ou de l'eau de dissolution.

Étudions le cas de deux macro-éléments importants: l'azote et le soufre.

• **L'azote**

Il est en général fourni et assimilé sous forme d'ions NH_4^+ (ammonium). D'autres composés minéraux peuvent, dans certains cas, convenir:

- les **nitrate**s, si la bactérie possède la nitrate-réductase B (dite assimilatrice) qui catalyse leur réduction en ions NH_4^+ ;
- l'**azote atmosphérique** N_2 : certaines bactéries possèdent une nitrogénase, complexe multienzymatique catalysant la transformation de N_2 en NH_4^+ .

Ce sont donc presque toujours les ions NH_4^+ qui sont assimilés.

Leur intégration aux acides aminés peut être ainsi schématisée:

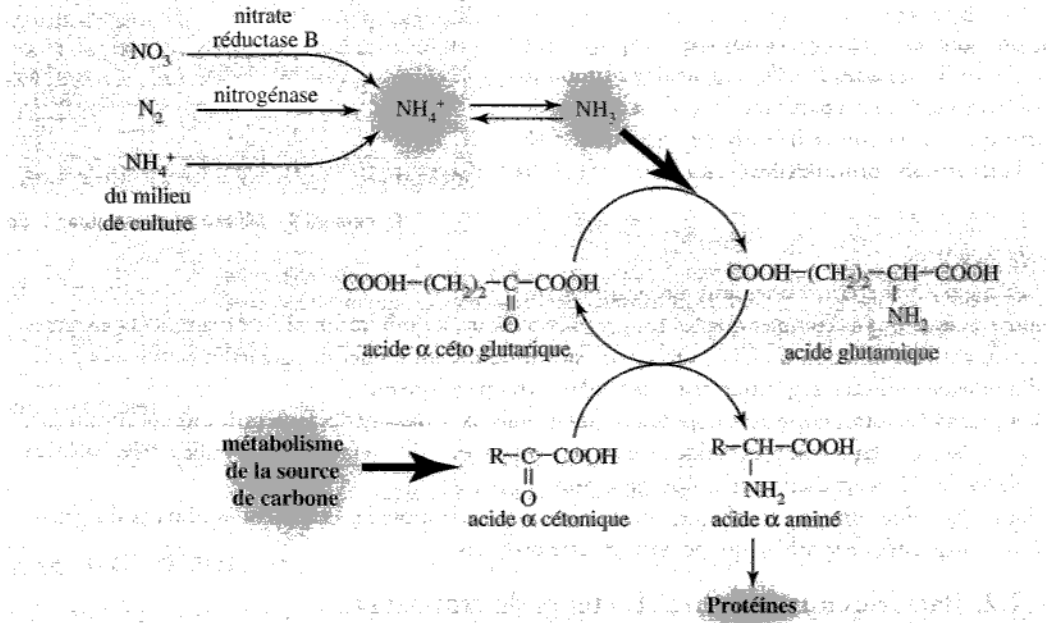
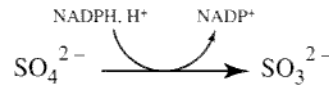


Fig. 2 – Assimilation de l'azote aux macromolécules

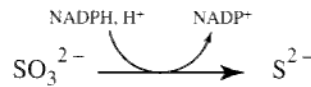
• **Le soufre**

La plupart des micro-organismes savent utiliser les ions sulfate SO_4^{2-} pour produire les deux acides aminés sulfurés présents dans leurs protéines (cystéine et méthionine), mais aussi les coenzymes contenant du soufre: biotine, thiamine, acide lipoïque. Cette assimilation du soufre peut être présentée en trois étapes:

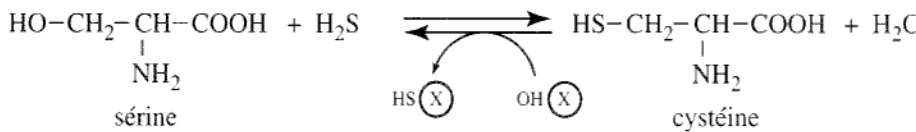
1. Réduction des sulfates en sulfites



2. Réduction des sulfites en sulfures



3. Incorporation des sulfures à la sérine



La synthèse des autres composés sulfurés se fait à partir de la cystéine.

La couverture des besoins en éléments non carbonés peut aussi être assurée par un extrait de viande ou son équivalent. La viande de bœuf contient tous les éléments précédemment cités; sa composition élémentaire est voisine de celle de la bactérie. L'extrait de viande contient aussi une quantité appréciable d'acides aminés libres qui sont absorbés sous cette forme et intégrés directement aux protéines.

1.4. La source de carbone

1.4.1. Autotrophie

Certaines bactéries sont capables de se développer sur un milieu strictement minéral. La seule source de carbone dont elles disposent est le dioxyde de carbone (CO_2) atmosphérique utilisé sous sa forme dissoute. Ces bactéries possèdent donc l'équipement enzymatique leur permettant de produire tous leurs constituants carbonés à partir du seul CO_2 , et, en particulier, d'assimiler le CO_2 par une série de réactions chimiques semblables à celles de la phase obscure de la photosynthèse (cycle de Calvin). Elles sont dites **autotrophes**.

1.4.2. Hétérotrophie

1.4.2.1. Bactéries prototrophes

Le document 3 donne la composition du milieu minimum pour la culture d'*Escherichia coli*.

Observons, en premier lieu, que ce milieu comporte une molécule carbonée, le glucose. *E. coli* ne peut donc produire tous ses constituants carbonés à partir du CO_2 . Il est capable de le faire à partir d'une seule source de carbone organique : c'est une bactérie **hétérotrophe prototrophe**.

Glucose	1 g
PO_4HK_2	10,5 g
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	3,5 g
NH_4Cl	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,005 g
NaCl	0,05 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,05 g

Document 3 – Milieu minimum pour *E. coli*

REMARQUES

Les bactéries hétérotrophes ont un équipement enzymatique moins complet que les autotrophes puisque, au minimum, il leur manque les enzymes catalysant l'assimilation du CO_2 . Observons que produire un millier de squelettes carbonés à partir d'une seule molécule organique reste, cependant, très performant.

Les bactéries autotrophes se développent aussi sur les milieux contenant des sources de carbone organique ; leur croissance y est même plus rapide car elles peuvent prélever directement dans le milieu des substances qu'elles devraient synthétiser en milieu minimum.

Pour déterminer un type trophique, on doit prendre en compte les exigences minimales du germe (ou les capacités de synthèse qui peuvent en être déduites).

1.4.2.2. Bactéries auxotrophes- Facteurs de croissance

Proteus vulgaris ne peut se développer sur le milieu minimum d'*Escherichia coli*. Par contre, sa culture devient possible si l'on rajoute à ce milieu une petite quantité d'acide nicotinique. *P. vulgaris* est donc capable de produire, à partir du glucose, tous ses constituants carbonés, à l'exception de l'acide nicotinique. Ce dernier est un facteur de croissance pour *P. vulgaris*, qui est dit **auxotrophe** vis-à-vis de l'acide nicotinique.

Un **facteur de croissance** est un constituant de la bactérie que celle-ci ne peut produire à partir de ses sources de carbone.

Il doit donc être obligatoirement ajouté au milieu minimum (par exemple : sels minéraux + glucose) adapté à la culture de la souche prototrophe.

Une souche exigeant un ou plusieurs facteurs de croissance est dite **auxotrophe** à cette ou ces substance(s).

Les facteurs de croissance sont de nature chimique très diverse selon les souches utilisées. La plupart des vitamines sont concernées.

Ils ne sont indispensables qu'à faible dose (il ne s'agit pas de source de carbone) car ils jouent dans le métabolisme bactérien un rôle catalytique.

• Nature chimique et propriétés des facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont soit des acides aminés, soit des bases puriques ou pyrimidiques, soit des vitamines.

Lorsqu'une bactérie, à partir de la source de carbone et d'azote qui lui est proposée, ne sait synthétiser un acide aminé, une base purique, une base pyrimidique, c'est la synthèse de protéines indispensables ou des acides nucléiques qui est affectée. On comprend alors que la croissance ne soit pas possible.

Le cas des vitamines est sensiblement différent. Les vitamines sont des coenzymes ou des précurseurs de coenzymes. L'acide nicotinique, la vitamine B2 (ou riboflavine) sont des constituants de coenzymes de déshydrogénation (respectivement du NAD^+ et du FAD) indispensables aux oxydations génératrices d'énergie. La thiamine est le coenzyme des réactions de décarboxylation, la biotine catalyse les carboxylations... On pourrait multiplier les exemples. Si la bactérie est dépourvue

de l'un de ces coenzymes, ce sont des voies métaboliques essentielles qui sont bloquées, ce qui explique l'absence de croissance.

Un caractère commun à tous les facteurs de croissance est leur action à faible concentration: 25 mg.L⁻¹ pour les acides aminés, 10 mg.L⁻¹ pour les bases puriques et pyrimidiques, 1 à 25 mg.L⁻¹ pour les vitamines.

1.4.3. Diversité des sources de carbone chez les bactéries hétérotrophes

Le carbone représente 50 % de la masse sèche des bactéries: il doit être disponible en quantité importante.

Nous avons vu qu'une bactérie autotrophe possède la capacité de produire tous ses constituants carbonés à partir du seul dioxyde de carbone atmosphérique (ou dissous dans le milieu de culture).

Les bactéries hétérotrophes, à l'inverse, ne peuvent synthétiser leurs constituants carbonés qu'à partir de substances plus élaborées, de nature organique: sucres, acides aminés, alcools, acides organiques...

Les exigences des micro-organismes sont, sur ce plan, très variées. Certains assimilent un très grand nombre de substrats, d'autres sont spécifiques d'un seul composé. On admet comme vraisemblable que tout composé organique naturel peut être source de carbone pour au moins une espèce bactérienne. Ainsi, le méthane (CH₄) peut être utilisé par *Pseudomonas methanica* pour la synthèse de ses constituants carbonés. Des souches se développant à partir des hydrocarbures, de la cellulose, de la lignine, des phénols sont connues et parfois utilisées dans la lutte contre les pollutions engendrées par certains rejets industriels.

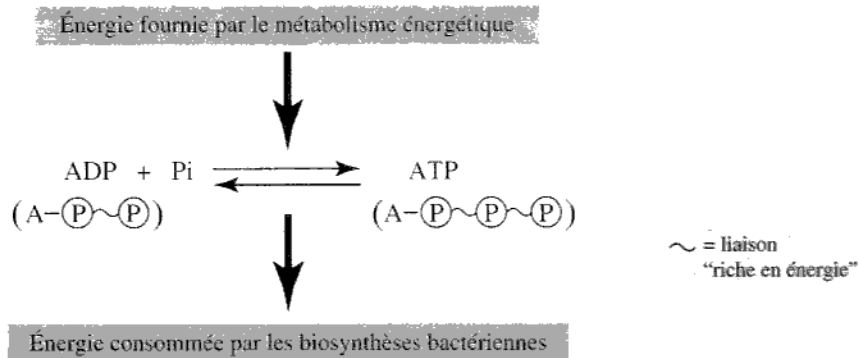
1.4.4. Relations des bactéries avec les nutriments carbonés

	Croissance sur		
	milieu synthétique strictement minéral	milieu synthétique minéral + une source de carbone organique	milieu synthétique minéral + une source de carbone organique + mélange de facteurs de croissance
Autotrophe	+	+	+
Hétérotrophe prototrophe	-	+	+
Hétérotrophe auxotrophe	-	-	+

Tableau 2 – Tableau récapitulatif

1.5. La source d'énergie

La synthèse des constituants bactériens s'effectue à partir des nutriments puisés dans le milieu de culture. Leurs transformations et leur assemblage consomment de l'énergie: le rôle du métabolisme énergétique est de produire cette énergie.



Dans la cellule bactérienne, comme dans la cellule eucaryote, une molécule assure le couplage entre les réactions exothermiques et endothermiques du métabolisme: c'est l'adénosine triphosphate ou ATP.

Deux ensembles bactériens peuvent être distingués selon l'origine de l'énergie:

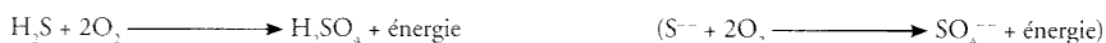
- les bactéries **phototrophes**, qui, grâce à des pigments photosensibles comme la bactériochlorophylle, transforment l'énergie lumineuse en ATP;
- les bactéries **chimiotrophes**, les plus nombreuses, qui utilisent l'énergie libérée par l'oxydation de substances chimiques réductrices.

Ces substances peuvent être minérales (on parle alors de bactéries **chimioolithotrophes**) ou organiques: ce sont les bactéries **chimio-organotrophes**, les plus nombreuses.

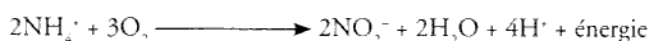
Les bactéries pathogènes ne sont rencontrées que chez les chimio-organotrophes.

• **Trois exemples de bactéries chimiolithotrophes**

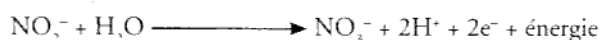
Les bactéries du genre *Thiobacillus* sont présentes dans les eaux sulfureuses; elles produisent leur énergie en oxydant le sulfure d'hydrogène (H₂S) ou ses sels (les sulfures):



Les bactéries du genre *Nitrosomonas* sont présentes dans le sol où elles oxydent l'ion ammonium NH₄⁺:



Celles du genre *Nitrobacter* poursuivent dans le sol l'action des précédentes en oxydant l'ion nitrite en nitrate:

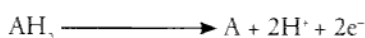


On voit que ces bactéries jouent un rôle important dans les cycles de la matière.

• **Le cas des bactéries chimio-organotrophes**

Un ou plusieurs nutriments carbonés présents dans le milieu de culture sont oxydés.

Cette oxydation revient souvent à une déshydrogénation (et donc à une libération d'électrons):



La source d'énergie ainsi oxydée peut être de nature biochimique variée: glucides, acides aminés, acides gras...

Les électrons libérés doivent, après un cheminement plus ou moins long sur des transporteurs, être pris en charge par un accepteur qui est un oxydant.

Cet accepteur peut être l'oxygène ou des ions minéraux (CO₃²⁻, SO₄²⁻...): on parle alors de **respiration**.

Il peut être de nature organique dans les **fermentations**.

• **Source de carbone et source d'énergie**

De nombreux substrats carbonés peuvent être, chez les bactéries chimio-organotrophes, à la fois source de carbone et source d'énergie.

Cependant, les milieux fournissent souvent une grande variété de molécules carbonées dont certaines ne sont utilisées que pour les biosynthèses (source de carbone), d'autres pour la production d'énergie. Ces aptitudes sont des caractéristiques d'une bactérie et donc un élément important de son identification.

1.6. Notion de milieux de culture

Un milieu de culture est une préparation au sein de laquelle des micro-organismes peuvent se multiplier. L'étude précédente a montré qu'un bon milieu de culture doit satisfaire aux conditions suivantes:

- couvrir les besoins élémentaires et les besoins en facteurs de croissance du micro-organisme à étudier;
- être isotonique;
- présenter un pH voisin de la valeur optimale pour le germe à étudier.

On distingue classiquement deux catégories de milieux de culture: les milieux synthétiques et les milieux empiriques.

1.6.1. Les milieux synthétiques

Leur composition est exactement connue, qualitativement et quantitativement. Ils sont conçus en fonction des besoins d'un micro-organisme ou d'un groupe de micro-organismes voisins. Ils sont peu utilisés en microbiologie alimentaire; nous n'en présenterons qu'un seul, à titre d'exemple, celui adapté à la culture des bactéries du genre *Azotobacter*.

Milieu synthétique pour <i>Azotobacter</i>	Solution de Winogradski
Solution de Winogradski..... 125 cm ³	MgSO ₄ · 7H ₂ O..... 0,02 g
Sulfate de calcium..... 0,1 g	K ₂ HPO ₄ 1,0 g
Solution d'oligoéléments..... 3 gouttes	FeSO ₄ · 7H ₂ O..... 0,05 g
Mannitol..... 5 g	CaCl ₂ 0,02 g
Eau distillée qsp..... 1 litre	MnCl ₂ · 4H ₂ O..... 0,02 g
	NaMoO ₄ · 2H ₂ O..... 0,001 g
	pH 8,5

Document 4 – Milieu de synthèse pour *Azotobacter*

1.6.2. Les milieux empiriques

Leur domaine d'utilisation est plus vaste et recouvre la microbiologie alimentaire.

Les éléments minéraux, la source de carbone, la source d'énergie, certains facteurs de croissance sont fournis par un extrait de viande ou de levures, par des peptones, éventuellement par des liquides biologiques.

1.6.2.1. Les milieux empiriques de base, d'utilisation générale

Ils contiennent les composants précédemment cités, à l'exclusion de liquides biologiques. L'extrait de viande est une macération de viande, soumise à une ébullition de 15 à 20 minutes, filtrée et concentrée par évaporation. Les extraits de levures proviennent de l'hydrolyse de levures de boulangerie. Les peptones, pepsiques, trypsiques ou papaïniques résultent de la digestion plus ou moins avancée, par l'action de la pepsine, de la trypsine ou de la papaïne, de différents substrats protéiques : viande, caséine, soja. Leur composition est très variable selon la nature des protéines et des enzymes protéolytiques utilisées pour leur fabrication. Dans l'ensemble, les peptones pepsiques contiennent une proportion importante de peptides de masse moléculaire élevée, les peptones trypsiques et papaïniques renferment, au contraire, beaucoup d'acides aminés libres et d'oligopeptides.

Parmi les milieux les plus usuels :

- certains contiennent à la fois de l'extrait de viande et une peptone

C'est le cas du bouillon nutritif et de la gélose nutritive (qui dérive du précédent par addition de 15 % d'agar agar).

Ces milieux conviennent pour la croissance de micro-organismes peu exigeants comme les staphylocoques, les entérobactéries, *Pseudomonas*, les vibrions, *Bacillus*;

- d'autres sont essentiellement constitués de peptones.

Citons l'eau peptonée, la gélose trypto-caséine-soja et la gélose Columbia.

Extrait de viande de bœuf	5g
Peptone trypsique	10g
Chlorure de sodium	5g
Eau distillée	1 L

Document 5 – Composition du bouillon nutritif

Eau peptonée

Peptone	1 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	1 litre

Gélose trypto-caséine-soja (composition pour 1 litre)

Peptone trypsique de caséine	15 g
Peptone papaïnique de soja	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar agar (Gélose)	15 g
pH = 7,3	

Gélose Columbia (composition pour 1 litre)

Peptone trypsique de caséine	5 g
Peptone pepsique de viande	5 g
Peptone trypsique de cœur	3 g
Hydrolysate de levures	10 g
Amidon de maïs	1 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar agar	15 g
pH = 7,3	

Document 6 – Milieux riches en peptones

Les milieux Columbia et trypto-caséine-soja sont constitués d'un mélange de peptones animales et végétales riches en facteurs de croissance et en acides aminés. Ceci explique qu'ils soient doués d'un haut pouvoir nutritif et que l'on puisse obtenir le développement des bactéries réputées de culture difficile : *Neisseria*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Brucella*, *Corynebacterium*. Les micro-organismes moins exigeants s'y développent plus rapidement et y donnent des cultures plus abondantes que sur gélose nutritive.

1.6.2.2. Les milieux enrichis

Ils sont obtenus en incorporant aux milieux de base précédemment décrits, du sang de cheval ou de mouton, du sérum, du liquide d'ascite ou divers suppléments polyvitaminiques commercialisés. Ces additifs apportent de nombreux facteurs de croissance. Les milieux enrichis sont utilisés pour les micro-organismes dont les exigences nutritives sont importantes et qui ne se développent pas ou mal sur les milieux usuels.

1.6.2.3. Les milieux sélectifs

Ce sont des milieux de culture inhibant le développement de certains groupes bactériens. À une base nutritive adaptée, sont ajoutés des inhibiteurs (antibiotiques ou antiseptiques) ; seuls les micro-organismes résistants peuvent se développer. Un milieu sélectif est utilisé pour sélectionner, au sein d'un ensemble pluribactérien complexe, un ou plusieurs groupes bactériens que l'on souhaite étudier qualitativement ou quantitativement.

1.6.3. Quelques exemples de milieux de culture d'usage courant en microbiologie alimentaire

1.6.3.1. Gélose pour dénombrement des micro-organismes aérobies totaux

Il s'agit d'un milieu riche, permettant le développement de la plupart des micro-organismes susceptibles d'être rencontrés dans un aliment. Sa formule comprend une peptone riche en acides aminés libres et de l'extrait de levures. L'association de ces deux constituants fournit au milieu de nombreux facteurs de croissance.

Tryptone	5 g
Extrait de levures	2,5 g
Glucose	1 g
Gélose	9 g
Eau distillée	1 litre

Document 7 – Gélose pour dénombrement des micro-organismes aérobies totaux

1.6.3.2. Un milieu pour le dénombrement des coliformes : le milieu Désoxycholate-Citrate-Lactose (DCL)

Il s'agit d'un milieu sélectif. Il contient du désoxycholate à la concentration de 0,1 %. Ce composé inhibe le développement des bactéries à Gram positif et rend donc le milieu sélectif pour les bacilles à Gram négatif. Parmi ces derniers, les coliformes sont repérés par leur capacité à fermenter le lactose (avec production de gaz). Le milieu DCL contient aussi du lactose et un indicateur de pH, le rouge de phénol. Les coliformes, acidifiant le milieu du fait de la fermentation du lactose, entraîneront le virage de l'indicateur au rouge brique. Les colonies rouges seront ainsi comptées comme des colonies de coliformes.

1.6.3.3. Exemple d'un milieu sélectif pour l'isolement des *Salmonella*: la gélose SS (*Salmonella Shigella*)

Ce milieu renferme deux substances, le désoxycholate et le vert brillant, inhibant la croissance des bactéries à Gram positif et ralentissant celle des bactéries à Gram négatif autres que *Salmonella* et *Shigella*. Il contient du lactose, du rouge neutre et un indicateur d' H_2S : le citrate de fer. La plupart des *Salmonella* donnent sur ce milieu des colonies incolores (car ne fermentant pas le lactose et n'acidifiant donc pas le milieu), à centre noir (du fait de la production d' H_2S se combinant aux ions Fe^{2+} pour former du sulfure de fer noir).

1.6.3.4. Deux milieux préconisés pour le dénombrement des staphylocoques

• Le milieu de Chapman

Son pouvoir inhibiteur est obtenu par de fortes concentrations de chlorure de sodium (7,5 %) qui sélectionnent les micro-organismes halophiles, parmi lesquels figurent les staphylocoques, mais aussi les microcoques, les entérocoques, certains *Bacillus*, certaines levures et même de rares bacilles à Gram-.

Les souches de staphylocoques forment des colonies opaques entourées d'un halo jaune dû à l'utilisation du mannitol avec acidification du milieu (et virage de l'indicateur, le rouge de phénol, du rouge au jaune).

• Le milieu de Baird Parker

Ce milieu est rendu sélectif par l'action du tellurite qui inhibe la plupart des bactéries à Gram négatif et sert aussi d'indicateur par sa réduction en tellure noir. C'est un milieu riche du fait de la présence de jaune d'œuf, de pyruvate et de glycolle. Le jaune d'œuf permet la mise en évidence de la lécithinase de *Staphylococcus aureus* par opacification du milieu autour des colonies.

Les colonies de *Staphylococcus aureus* apparaissent, en 24 à 48 heures, noires (réduction du tellurite), entourées d'un halo clair dû à la protéolyse des protéines du jaune d'œuf, et d'une zone opaque plus petite due à la lécithinase.

2. Multiplication

2.1. Phénomènes morphologiques accompagnant la division bactérienne

Les bactéries se divisent par scission.

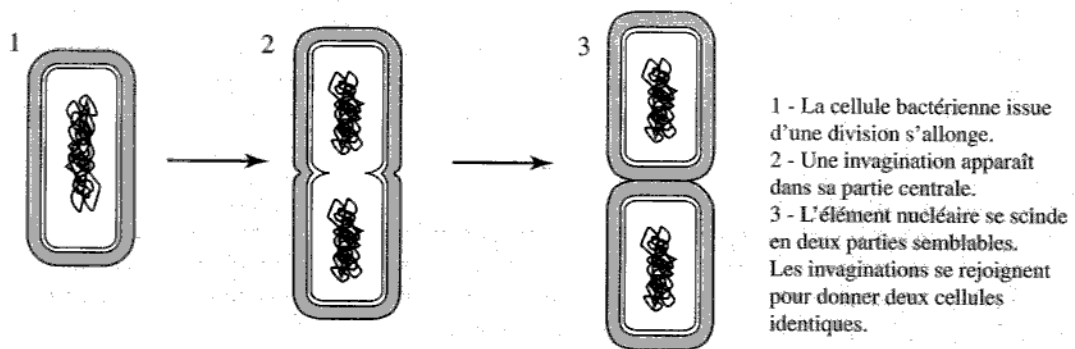


Fig. 3 – Division bactérienne

2.2. Aspects génétiques

Au cours de la division, le chromosome est exactement répliqué. Il s'ouvre d'abord en un point, les deux brins se séparent progressivement tandis que deux brins complémentaires se forment. La figure 4 illustre le mécanisme du processus.

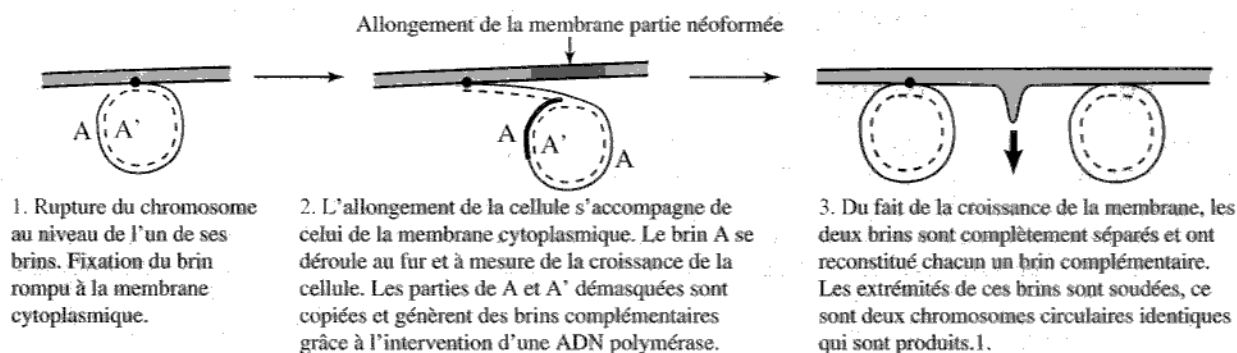


Fig. 4 – Mécanisme de réplication du chromosome bactérien

2.3. Notion de culture pure

De l'étude précédente, il ressort que si l'on introduit dans un milieu de culture un petit nombre de bactéries identiques, elles se multiplient par scissiparité pour produire une population abondante dont toutes les cellules ont le même patrimoine génétique (donc les mêmes caractères). La culture est dite pure.

L'identification des bactéries ne peut être envisagée qu'à partir d'une culture pure.

• Obtention d'une culture pure

Soit une culture A à purifier.

Cette opération peut se dérouler en trois jours.

1^{er} jour

Étalement de la culture à purifier sur un milieu gélosé coulé en boîte de Petri. On utilise une anse de platine (ou oëse). L'inoculum contenu dans la boucle est épuisé progressivement en formant des stries serrées à la surface de la gélose. À la fin de l'étalement, la quasi-totalité des bactéries aura déjà été déposée sur la gélose, les bactéries y seront rares et assez éloignées les unes des autres. La boîte est mise à incuber.

2^e jour

Pendant l'incubation, chaque bactérie déposée sur la gélose se multiplie pour former une colonie constituée de bactéries possédant le même chromosome, donc les mêmes caractères. On repique cette colonie sur une nouvelle plaque de gélose ou dans un bouillon nutritif.

3^e jour

Après une nouvelle incubation, on obtient une culture pure.

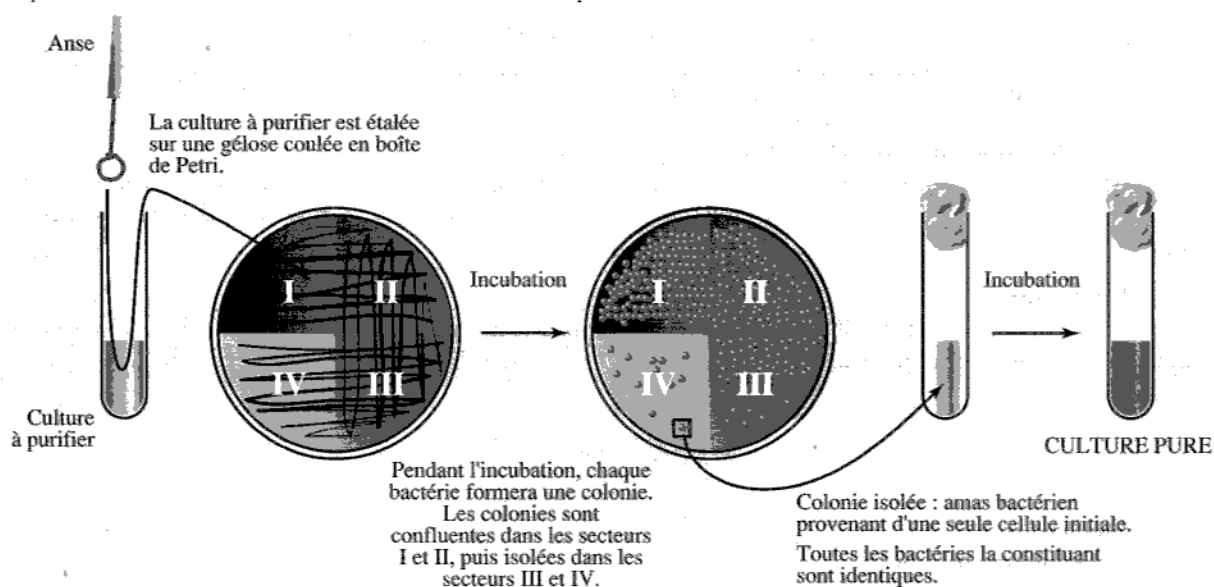


Fig. 5 – Obtention d'une culture pure

3. Croissance des populations bactériennes

3.1. Mesure de croissance

Pour suivre l'évolution d'une population bactérienne, plusieurs paramètres peuvent être retenus :

- la détermination du nombre de cellules par unité de volume ;
- la mesure de la masse microbienne (ce paramètre est, en effet, en relation directe avec le précédent) ;
- la mesure d'un constituant. On choisit alors un constituant stable et dont la concentration est stable **dans les cellules** quelle que soit la phase de la croissance. Sa teneur dans le milieu ne sera, dans ces conditions, fonction que du nombre de bactéries ;
- la mesure d'une activité microbienne.

3.1.1. Détermination du nombre de cellules par unité de volume

On y accède par des techniques de dénombrement.

3.1.1.1. Dénombrement au microscope

Un volume connu ($0,01 \text{ cm}^3$) de culture en milieu liquide est étalé sur une lame porte-objet dans un espace bien délimité (1 cm^2). La culture est séchée, fixée et colorée, puis les bactéries comptées dans plusieurs champs microscopiques. Le diamètre (et donc la surface $\pi d^2/4$) d'un champ est mesuré à l'aide d'un micromètre objectif. Connaissant le nombre moyen de bactéries dans la surface d'un champ, il est aisé de calculer celui contenu dans 1 cm^2 .

Soit d le diamètre d'un champ en cm, n le nombre de bactéries comptées dans ce champ.

Il y a n bactéries dans : $\frac{\pi d^2}{4} \text{ cm}^2$

$\frac{4n}{\pi d^2}$ est le nombre de bactéries dans $0,01 \text{ cm}^3$

$N \text{ bactéries.cm}^{-3} = \frac{400 n}{\pi d^2}$

Ce procédé a pour avantage sa simplicité et pour inconvénient de compter les bactéries vivantes et les bactéries mortes (seules les premières sont significatives).

3.1.1.2. Dénombrement par dilutions, incorporation et culture dans un milieu gélosé

Cette méthode peut être décomposée en trois temps.

1. Dilutions de l'inoculum

À partir de l'inoculum, on réalise une série de dilutions décimales ($1/10$, $1/100$, $1/1000$...).

On utilise, dans ce but, des tubes contenant 9 millilitres d'eau physiologique stérile, et on reporte, de tube en tube, un millilitre de chaque dilution.

2. Incorporation en gélose et culture

Dans une série de boîtes de Petri stériles, on mélange un millilitre de chaque dilution avec le contenu d'un flacon de gélose fondue et refroidie à $40-45 \text{ }^\circ\text{C}$. On laisse alors solidifier la gélose, puis les boîtes sont mises à incuber à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 18 heures.

3. Comptage

Chaque bactérie vivante (on dit revivifiable) donne, en se multipliant, une colonie visible à l'œil nu. Si la culture est très dense, les colonies sont confluentes dans les premières boîtes. On choisit la boîte où le nombre de colonies (n) est compris entre 30 et 300.

$$N = n \cdot d$$

d étant la dilution

N le nombre de bactéries par litre.

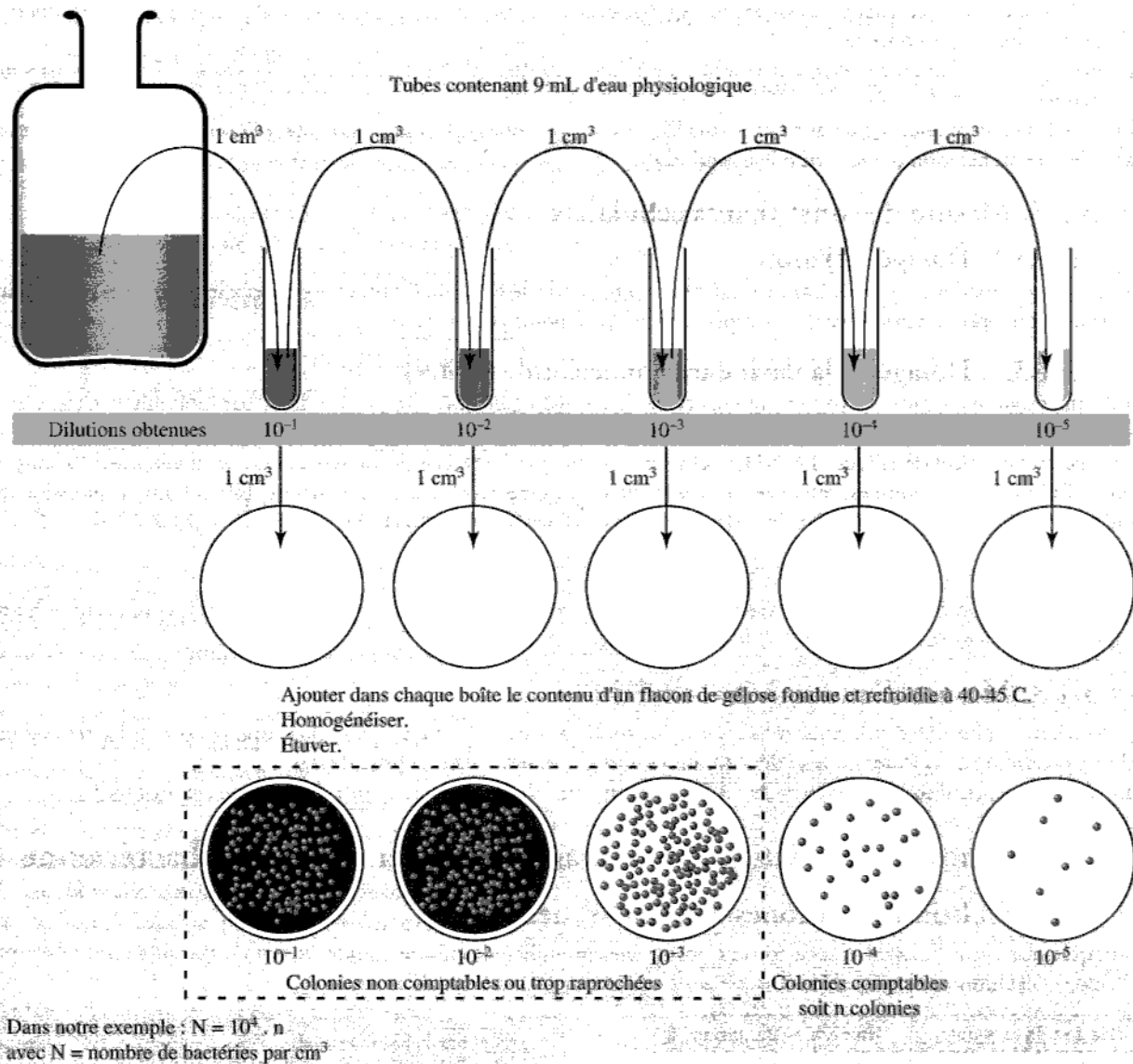


Fig. 6 – Dénombrement par dilutions et incorporation en gélose

3.1.2. Mesure de la masse des cellules bactériennes

3.1.2.1. Mesure directe : détermination du poids sec

La culture est centrifugée, lavée plusieurs fois avec une solution tampon et séchée jusqu'à poids constant.

Cette méthode est peu employée car elle présente plusieurs inconvénients :

- elle mesure la masse de l'ensemble des bactéries mortes et vivantes ;
- le lavage et la dessiccation entraînent des pertes de substances (solubles ou volatiles) ;
- elle est longue et plutôt fastidieuse.

3.1.2.2. Mesure indirecte par la mesure du trouble

En mesurant le trouble, on mesure, en fait, le pouvoir diffractant de la suspension. Cette méthode consiste à évaluer la turbidimétrie d'une suspension en mesurant, dans un spectrophotomètre, la quantité de lumière diffractée. Celle-ci est lue sur l'appareil comme une diminution de l'intensité du rayon incident et s'exprime en absorbance.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = K \times c$$

I_0 intensité du rayon incident

I intensité du rayon transmis

A absorbance

c concentration bactérienne

On peut donc suivre la croissance d'une population bactérienne en mesurant l'évolution de l'absorbance à 650 nanomètres à l'aide d'un spectrophotomètre.

La relation n'est valable que pour des troubles de faible importance. Au-delà de certaines valeurs, les dilutions sont nécessaires.

Cette méthode ne permet pas de distinguer bactéries vivantes et mortes. On peut cependant l'étalonner en pratiquant en parallèle une numération par la méthode des dilutions.

3.1.3. Mesure de constituants cellulaires

3.1.3.1. Dosage de l'azote

La culture est centrifugée et lavée. L'azote est dosé par la méthode de Kjeldahl. Ce procédé présente les mêmes inconvénients que la détermination du poids sec. Il est, cependant, un peu moins fastidieux.

3.1.3.2. Dosage de la flavine mononucléotide (FMN)

La flavine mononucléotide (FMN) est un coenzyme de déshydrogénation. On peut la doser par bioluminescence. Cette méthode, très sensible, repose sur le principe suivant :

la flavine mononucléotide réduite (FMNH₂) peut être oxydée par l'oxygène en présence d'un aldéhyde saturé à longue chaîne (RCHO). La réaction est catalysée par une enzyme d'origine bactérienne : la luciférase. Elle conduit à l'émission de lumière.



L'intensité de la lumière produite est mesurée. Elle est proportionnelle à la concentration en FMNH₂ et donc au nombre de cellules dans la prise d'essai.

3.1.4. Mesure d'une activité cellulaire

La technique la plus fiable et la plus utilisée est la microcalorimétrie. On mesure la chaleur dégagée par les bactéries d'un volume déterminé de culture. Celle-ci dépend du nombre de bactéries dans la prise d'essai.

Une méthode très utilisée est la mesure de l'ATP. Son principe, un peu complexe, sort du cadre de cet ouvrage ⁽¹⁾.

3.2. Quelques caractéristiques et paramètres de la croissance bactérienne

3.2.1. Cultures synchrones et asynchrones

Soit N₀ le nombre de bactéries inoculées au temps 0 dans un milieu de culture liquide.

Calculons l'évolution de la population bactérienne en fonction du nombre de scissions.

Nombre de scissions	Nombre de bactéries / L ⁻³
0	N ₀
1	2 · N ₀
2	2 · 2N ₀ = 2 ² N ₀
3	2 ³ N ₀
...	...
...	...
n	2 ⁿ · N ₀

Tableau 3 – Calcul du nombre de bactéries

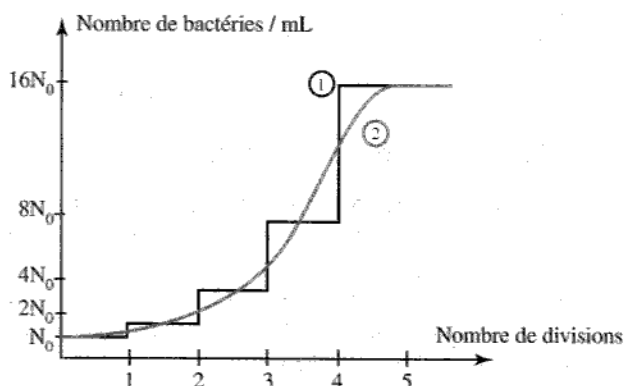


Fig. 7 – Évolution d'une population bactérienne en fonction du nombre de divisions

Si l'on représente graphiquement ces résultats, deux tracés sont possibles (fig. 7) :

- **tracé 1** : les bactéries inoculées sont toutes au même stade de leur évolution lors du processus de division. Elles se divisent toutes au même moment : la culture est synchrone ;
- **tracé 2** : les bactéries de l'inoculum sont à des stades différents de leur évolution ; l'évolution de la population est continue : la culture est asynchrone.

(1) Se reporter à *Microbiologie générale* de A. MEYER et J. DELANA.

3.2.2. Temps de doublement – Vitesse spécifique de croissance

- Le temps de doublement ou temps de génération (G)

C'est l'espace de temps écoulé entre deux divisions en phase exponentielle de croissance (phase III de la courbe fig. 8).

- La vitesse spécifique de croissance (μ)

Elle représente l'accroissement de la concentration bactérienne par unité de temps.

QUELQUES EXEMPLES EN PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE

Escherichia coli $\mu = 2$ divisions/heure

 G = 30 minutes

Vibrio parahaemolyticus

$\mu = 3$ divisions/heure

 G = 20 minutes

Mycobacterium tuberculosis

$\mu =$ très petit

 G = plusieurs jours

3.3. La courbe de croissance en milieu non renouvelé

Dans un milieu non renouvelé, la croissance d'une population bactérienne s'arrête après 16 à 24 heures de culture (sauf espèces à croissance lente) du fait de la raréfaction des nutriments et de l'accumulation des substances toxiques.

En pratique, pour obtenir une courbe de croissance, on inocule au temps 0 un milieu liquide avec un petit nombre de bactéries, puis on pratique des prélèvements périodiques (toutes les heures par exemple).

Sur chaque prélèvement, on mesure un des paramètres étudiés précédemment.

La courbe tracée représente l'évolution du logarithme du nombre de bactéries par unité de volume (ou son équivalent) en fonction du temps.

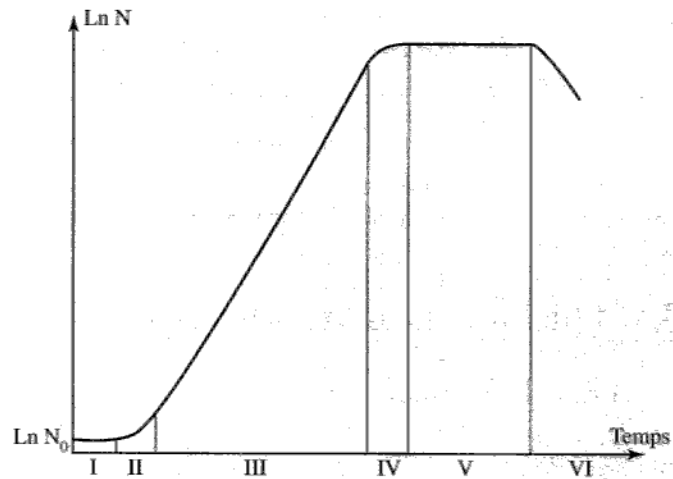


Fig. 8 – Courbe de croissance en milieu non renouvelé

- La phase de latence (I)

Elle est facultative. Lorsqu'elle existe, c'est une phase d'adaptation de la bactérie au milieu. $N = N_0$, la vitesse spécifique de croissance (μ) reste nulle, les bactéries ne se divisent pas ou trop peu pour que l'on puisse mesurer une variation de la concentration bactérienne.

Lorsque des cellules jeunes (prélevées dans une culture de quelques heures) sont placées dans un milieu neuf de même composition, la culture repart sans phase de latence. Au contraire, si l'on inocule des bactéries âgées dans un même milieu neuf ou des bactéries jeunes dans un milieu de composition différente, on observe une phase de latence.

- La phase de latence correspond donc au temps nécessaire aux bactéries de l'inoculum pour synthétiser les enzymes indispensables, pour utiliser de nouveaux substrats ou (et) modifier certains paramètres physicochimiques (comme le pH) afin de les amener à des valeurs compatibles avec leur développement.
- La durée de la phase de latence est fonction de la méthode utilisée pour estimer N: elle est d'autant plus courte que la méthode utilisée est sensible.
- Pour les mêmes raisons, la durée de la phase de latence est d'autant plus réduite que l'inoculum est important.

- La phase d'accélération (II)

Les bactéries se divisent de plus en plus activement, la vitesse spécifique de croissance augmente avec le temps.

- La phase exponentielle de croissance (III)

La vitesse spécifique de croissance est **constante et maximale**; elle est notée μ_{exp} (μ_{exp} est encore appelée taux de croissance). Les bactéries se divisent à leur rythme le plus élevé.

La relation entre $\log N$ et t est linéaire ($\log N$ est directement proportionnel à t).

- La phase de ralentissement (IV)

La vitesse spécifique de croissance décroît progressivement jusqu'à une valeur nulle.

La phase exponentielle ne dure, en effet, que quelques heures. Lorsque les nutriments se raréfient, la croissance se ralentit, le phénomène s'accroissant au fur et à mesure de l'appauvrissement du milieu.

• La phase stationnaire (V)

La vitesse spécifique de croissance est constante et nulle. Un tel résultat admet deux explications qui se recoupent plus ou moins :

- les bactéries persistent sans se diviser ;
- Il y a autant de scissions que de bactéries qui meurent.

L'arrêt de la croissance peut être dû à une ou plusieurs causes suivantes :

- disparition d'un ou plusieurs nutriments ;
- acidification du milieu ;
- accumulation de déchets toxiques.

Le nombre de bactéries obtenues en phase stationnaire est le plus élevé qu'il soit possible d'obtenir dans des conditions expérimentales données. Il dépend surtout de la composition du milieu (fig. 9).

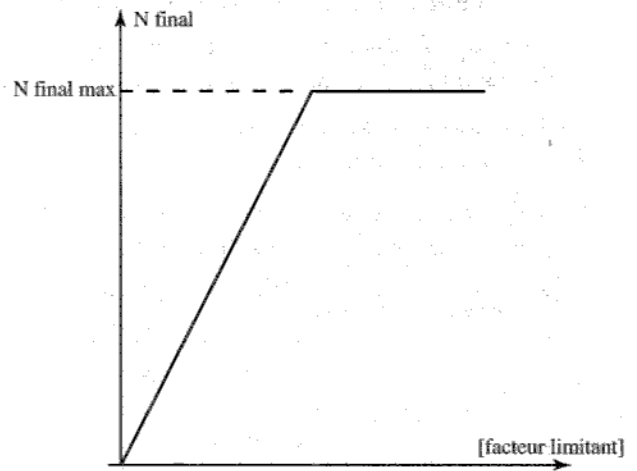


Fig. 9 – Évolution du nombre N_f de bactéries en phase stationnaire en fonction de la concentration en facteur limitant

Le rendement d'une culture peut être évalué par le rapport :

$$\frac{N_f}{[\text{facteur limitant}]} = \text{nombre de bactéries obtenues par gramme de substrat consommé.}$$

• La phase de déclin (VI)

Les bactéries ne se divisent plus. Certaines meurent et sont lysées. Le nombre N diminue. La phase de déclin est une phase de décroissance, μ est négatif.

3.4. Quelques facteurs influençant la croissance

3.4.1. La température

• Mesurons μ_{exp} dans les conditions expérimentales suivantes : mêmes bactéries incubées dans le même milieu, à des températures différentes.

μ_{exp} augmente avec la température jusqu'à une valeur optimale, puis décroît pour s'annuler au-delà d'une température dite létale.

La première partie de la courbe (t augmente, μ_{exp} augmente) s'explique par la loi d'Arrhénius qui postule que la vitesse des réactions chimiques croît avec la température. La croissance d'une bactérie peut être assimilée à un ensemble de réactions chimiques sensibles à « l'effet température ».

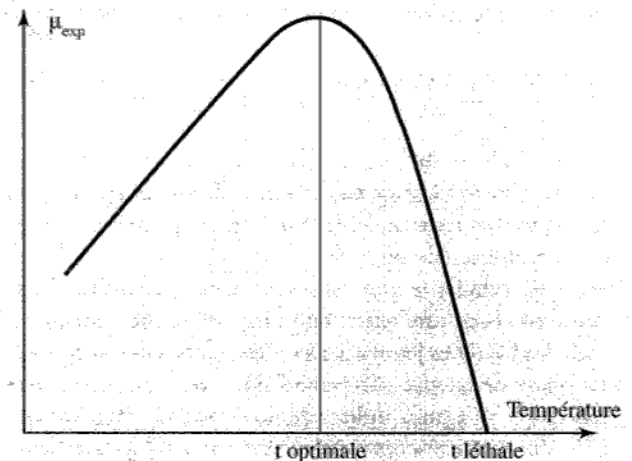


Fig. 10 – Influence de la température sur le taux de croissance exponentiel

• Les mêmes études faites sur des bactéries différentes montrent que les valeurs des températures optimale et létale varient très sensiblement selon les bactéries et permettent de les classer en quatre groupes :

Groupe	Température	Température minimale de croissance	Température optimale de croissance	Température maximale de croissance
Psychrophiles ⁽¹⁾		- 15 °C	15 à 20 °C	25 °C
Psychrotrophes		0 à 5 °C	25 à 35 °C	37 °C
Mésophiles		10 à 20 °C	37 °C	45 °C
Thermophiles		25 à 45 °C	50 à 55 °C	65 à 90 °C

(1) le terme de cryophile est synonyme de psychrophile

Tableau 4 – Bactéries et températures de croissance

Parmi les bactéries psychrophiles ou psychrotrophes, citons: *Listeria*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudo-monas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Erwinia*, *Corynebacterium*, certains *Lactobacillus*.

Leur temps de génération est de l'ordre de 24 heures à 0 °C.

Elles sont responsables des altérations des aliments conservés au froid. *Listeria* et *Yersinia* sont responsables des infections d'origine alimentaire dont la recrudescence coïncide avec la généralisation de la réfrigération.

Les courbes de croissance de chaque catégorie sont sensiblement différentes. Les bactéries thermophiles ont un développement rapide et restent peu de temps en phase exponentielle. À l'opposé, les germes psychrophiles et psychrotrophes ont une croissance lente et une phase exponentielle longue.

3.4.2. Le pH

Le pH du milieu influence aussi la valeur du taux de croissance exponentiel. Il est possible, comme précédemment, de déterminer un pH optimal de croissance (souvent, en fait, une zone de pH) et un pH d'inactivation.

Ainsi, il existe des bactéries acidophiles dont le pH optimal est bas (citons les *Lactobacillus*, les streptocoques lactiques) et des bactéries basophiles dont le pH optimal est élevé (proche de 9 pour les vibrions).

La plupart des bactéries ont leur développement maximal dans des milieux proches de la neutralité.

3.4.3. La concentration en substrat

Son rôle a été mis en évidence par Jacques Monod en étudiant les variations du taux de croissance exponentiel pour des cultures d'*Escherichia coli* dont les milieux ne différaient que par la concentration initiale en glucose. Le glucose est apporté au milieu en quantité variable, les autres nutriments étant présents en excès. Le glucose devient dans cette expérience le facteur limitant la croissance.

À l'examen de la figure 12, il apparaît que le μ_{exp} augmente fortement avec la concentration en facteur limitant jusqu'à une valeur limite au-delà de laquelle toute addition du facteur limitant ne procure plus d'amélioration de la croissance.

3.4.4. L'Aw

L'Aw est définie par le rapport des pressions de vapeur du milieu (qui peut être un aliment) et de l'eau pure. Elle mesure, en fait, la disponibilité de l'eau dans un produit. L'Aw varie donc de 0 à 1.

Les bactéries supportent assez mal, contrairement à de nombreuses moisissures et levures, des Aw faibles (produits à faible teneur en eau), et sont très sensibles à une diminution d'Aw. Voici quelques valeurs d'Aw correspondant aux limites inférieures de croissance de différentes bactéries.

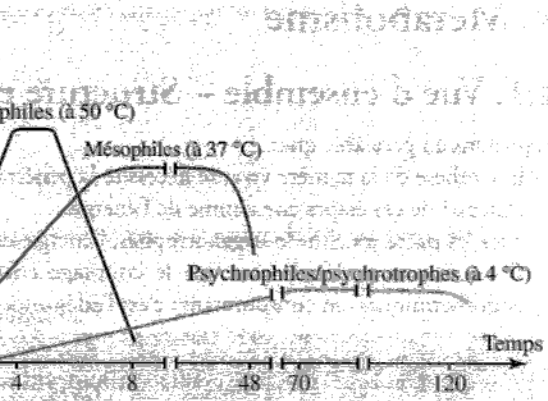


Fig. 11 – Courbes de croissance des bactéries thermophiles, mésophiles et psychrophiles

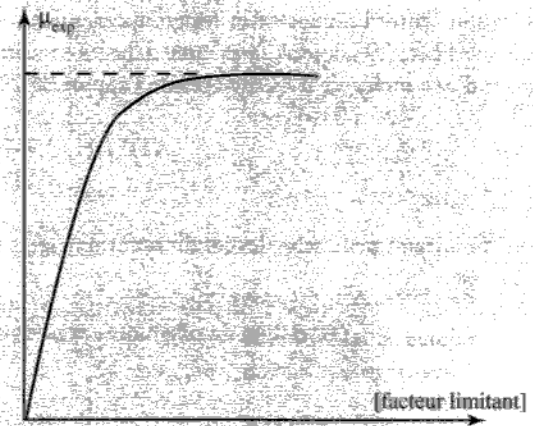


Fig. 12 – Variation du taux de croissance maximum en fonction de la concentration en facteur limitant

<i>Acinetobacter</i>	0,990
<i>Clostridium perfringens</i>	0,970
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,957
<i>Escherichia coli</i>	0,950
<i>Salmonella</i>	0,950
<i>Clostridium botulinum</i> A et B.....	0,950
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,860

Document 8 – Aw et limite inférieure de croissance

Ainsi, toute diminution de l'Aw entraîne une diminution sensible du taux de croissance maximum des bactéries: pour une Aw de 0,90, le taux de croissance de *Staphylococcus aureus* est réduit à 10 % de sa valeur maximale (qui est obtenue avec une Aw de 0,990).

Ces données ont des applications au niveau des techniques de conservation (séchage, lyophilisation...). D'autre part, la plupart des aliments frais, ayant des Aw variant entre 0,980 et 0,990, seront donc sujets à des altérations d'origine bactérienne; les denrées dont l'humidité relative est moindre seront attaquées préférentiellement par les moisissures.

4. Métabolisme

4.1. Vue d'ensemble – Structure et rôles de l'ATP

Rappelons au préalable que :

- la synthèse de la matière vivante nécessite la pénétration, la transformation et l'assemblage de nutriments ;
- chacune de ces étapes consomme de l'énergie ;
- chez les bactéries chimio-organotrophes, l'énergie est fournie par l'oxydation de substances chimiques ;
- Il existe une molécule assurant le couplage entre les réactions exothermiques productrices d'énergie et celles, endothermiques, en consommant : c'est l'adénosine triphosphate ou ATP.

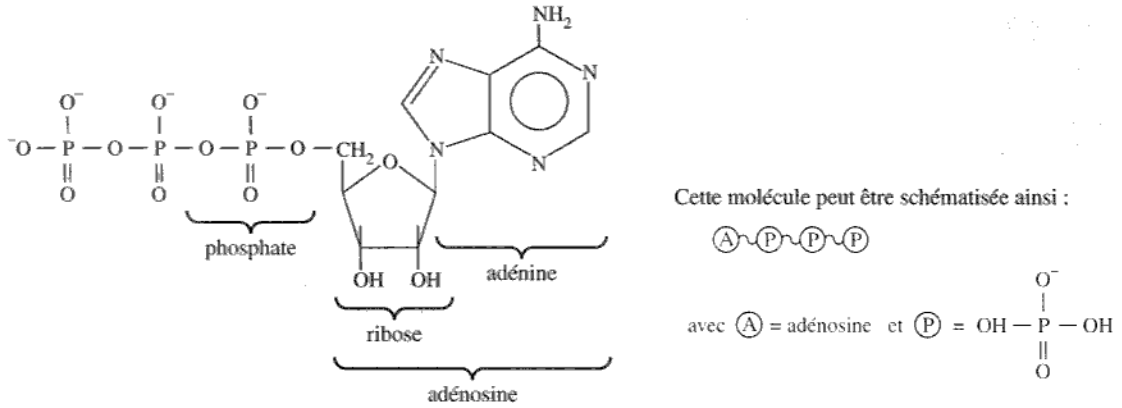
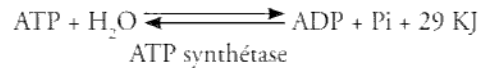


Fig. 13 – Structure de l'ATP

Les liaisons entre l'adénosine et les groupements phosphate sont symbolisées (~) et dites « riches en énergie » car leur hydrolyse libère 29 kilojoules par mole dans les conditions standard. De la même façon, la synthèse d'une molécule d'ATP à partir d'une molécule d'ADP nécessite l'apport de 29 kilojoules.



La même enzyme peut, selon les conditions, catalyser la réaction dans l'un ou l'autre sens et donc fonctionner éventuellement en ATPase.

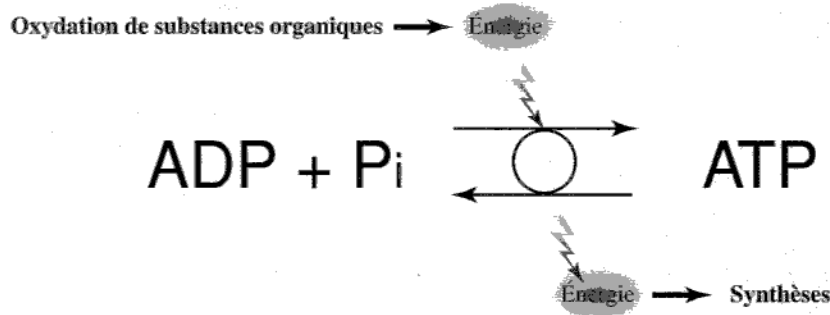


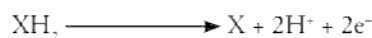
Fig. 14 – Schéma récapitulatif

4.2. Les principaux processus de la production d'énergie chez les micro-organismes

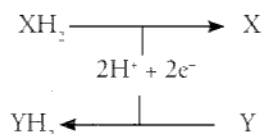
Les substrats organiques susceptibles d'être oxydés sont, généralement, des molécules hydrogénées, soit XH_2 . Leur oxydation correspond à une déshydrogénation :



Une oxydation est aussi définie comme une perte d'électrons par un substrat. L'écriture suivante permet de la mettre en évidence :



Les électrons libres, n'ayant qu'une existence très éphémère, doivent être pris en charge par un oxydant accepteur d'électrons ($Y \longrightarrow YH_2$) selon le schéma:



Il est possible d'identifier plusieurs voies métaboliques selon le trajet suivi par les électrons et la nature de leur accepteur final.

• 1^{er} cas

Les électrons passent sur une chaîne de transporteurs: c'est la respiration.

- L'accepteur final est l'oxygène: c'est la respiration aérobie.
- L'accepteur final est un ion minéral, plus rarement une substance organique: c'est la respiration anaérobie.

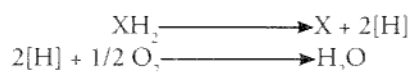
• 2^e cas

Il n'y a pas de chaîne de transporteurs d'électrons: c'est le cas des fermentations.

L'accepteur d'électrons (d'hydrogène) est une substance organique.

4.2.1. La respiration aérobie

Le bilan des réactions d'oxydoréduction associées à la respiration aérobie peut s'écrire:



L'énergie libérée est donc celle (considérable) de la synthèse de l'eau.

En fait, cette énergie est très supérieure à celle nécessaire à la production d'une molécule d'ATP.

L'existence de plusieurs étapes intermédiaires permet, en libérant l'énergie de façon fractionnée d'obtenir un meilleur rendement (3 ATP par paire d'hydrogène, pour le cas général).

Au cours de la respiration aérobie, les électrons arrachés au substrat transitent sur une chaîne de transporteurs qui sont des déshydrogénases dont les coenzymes jouent le rôle actif.

Le produit à oxyder passe par une série de produits intermédiaires (αH_2 , βH_2 , γH_2 ,... H_2O).

À chaque étape, il y a libération d'une fraction de l'énergie totale.

Plusieurs étapes se font avec une variation d'énergie suffisante pour faire fonctionner l'ATP synthétase.

L'ensemble de ces transporteurs et de l'ATP synthétase constitue la chaîne respiratoire (= chaîne cytochromique). Elle est située au niveau de la membrane cytoplasmique.

4.2.2. Les respirations anaérobies

Des chaînes respiratoires peuvent fonctionner en anaérobiose. L'accepteur final d'électrons est alors une substance minérale autre que l'oxygène.

Dans le cas de la respiration nitrate, la dernière enzyme de la chaîne cytochromique est la nitrate-réductase A qui catalyse la réduction, par les électrons transportés au niveau de la chaîne respiratoire, de nitrates en nitrites.

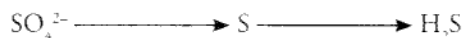


D'autres accepteurs minéraux peuvent être mis en jeu:

- nitrites réduits en ions ammonium



- sulfates réduits en soufre et hydrogène sulfuré



mais aussi:

- thiosulfates, sulfites, carbonates... réduits respectivement en hydrogène sulfuré et en méthane.

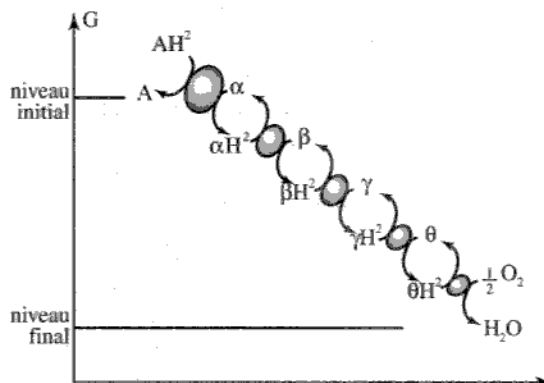


Fig. 15 - Schéma de la respiration aérobie

(● représente des déshydrogénases).
(α , β , γ , θ représentent les formes oxydées des différents coenzymes associés à ces déshydrogénases).

4.2.3. Le couplage entre les réactions d'oxydation et celles productrices d'ATP

Le résultat le plus important de l'activité des déshydrogénases de la chaîne respiratoire est de permettre l'accumulation des protons (H^+) sur la face externe de la membrane cytoplasmique, donc de créer un gradient électrochimique de part et d'autre de cette membrane. Ce gradient est générateur d'une force proton motrice, flux entrant de protons qui peut être comparé à un courant électrique puisqu'il s'agit d'un mouvement de charges. L'ATPase est capable de prélever l'énergie de ce flux de protons (comme un moteur électrique) et de la transformer en énergie de liaison. Il est admis qu'une liaison riche en énergie peut être produite sur la base de l'énergie de trois protons traversant la membrane¹.

Le mécanisme de ces phénomènes sort du cadre de cet ouvrage.

4.2.4. Les fermentations

Les fermentations seront étudiées plus en détail avec le métabolisme glucidique. Au cours des fermentations, l'oxydation du substrat s'accompagne de phosphorylations au niveau de celui-ci. L'accepteur d'électrons est une substance organique du métabolisme intermédiaire.

Les fermentations produisent moins d'énergie que les respirations : de l'ordre de la centaine de kilojoules alors que l'oxydation d'une mole de glucose fournit 2 817 kJ.

4.2.5. Relations des bactéries avec l'oxygène : types respiratoires

Les bactéries sont classées, en fonction de leur relation avec l'oxygène, en sept types respiratoires dont quatre sont très répandus.

- Le groupe des **anaérobies strictes** rassemble toutes les bactéries ne se développant qu'à l'abri de l'air.
- Les **aéro-anaérobies** peuvent croître aussi bien en présence qu'en l'absence d'oxygène. Dans ce groupe, il est possible de distinguer deux catégories :
 - les **bactéries aérobies facultatives** oxydent, en aérobiose, les substrats énergétiques et pratiquent, en anaérobiose, les fermentations ou (et) les respirations minérales ;
 - les **bactéries anaérobies facultatives** ou **anaérobies préférentielles** ne pratiquent que les voies indépendantes de l'oxygène.
- Les **aérobies strictes** ne se développent qu'en présence d'oxygène.
- Les **bactéries micro-aérophiles** ne se développent que sous une pression réduite d'oxygène.

4.2.5.1. Technique d'étude

La détermination du type respiratoire d'une bactérie se fait sur des milieux sans nitrates (ils pourraient servir d'accepteurs d'électrons), contenant du glucose, une base nutritive convenable, et qui sont conditionnés en tubes étroits : géloses VF ou TGY (Viande-Foie, *Trypticase Glucose Yeast*).

Ces milieux sont régénérés pendant trente minutes au bain d'eau bouillant pour en chasser l'oxygène dissous, puis refroidis à 40-45 °C et ensemencés en spirale (fig. 16). Après incubation, les aspects suivants peuvent être observés (fig. 17).

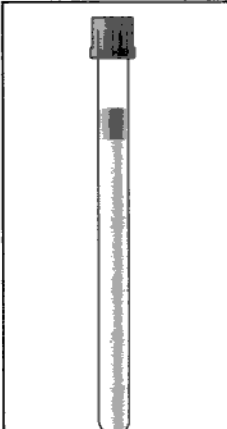
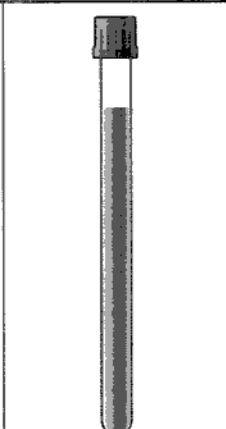
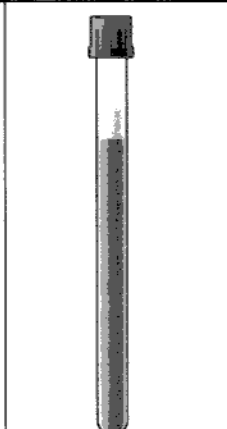
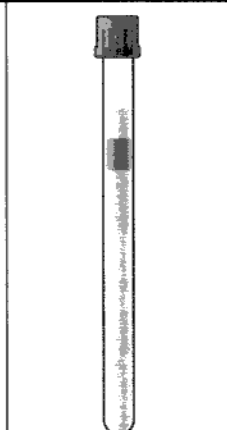
			
culture seulement en présence d'oxygène Type aérobie strict	culture quelle que soit la concentration en oxygène Type aéro-anaérobie	culture seulement en absence d'oxygène Type anaérobie strict	culture seulement dans une zone de pression en oxygène réduite Type micro-aérophile

Fig. 17 – Aspects en gélose VF de cultures de bactéries de différents types respiratoires

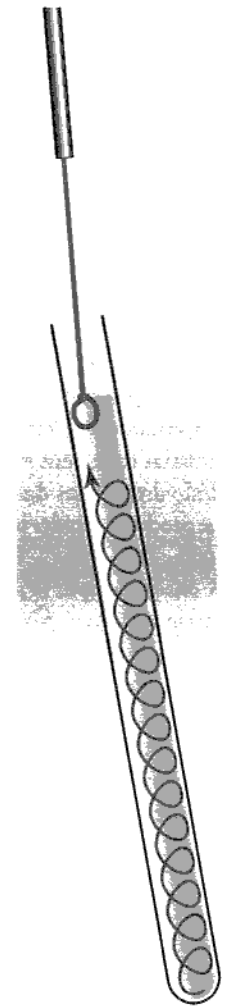


Fig. 16 – Technique d'ensemencement d'une gélose profonde en vue de la détermination du type respiratoire.

(1) Le lecteur intéressé consultera avec profit l'ouvrage de A. MÉYER, J. DEIANA, H. LECLERC : *Microbiologie générale*.

4.2.5.2. Interprétation

Au contact de l'air, de nombreuses réactions d'oxygénation ou d'oxydation de métabolites très variés ont lieu et fonctionnent avec le FAD. Dans certains cas, le FADH₂ produit peut être réoxydé par l'oxygène.

Le fonctionnement de ces enzymes conduit à la formation de superoxydes (O₂⁻) ou d'eau oxygénée (H₂O₂). Ces substances, très toxiques pour les cellules, doivent être détruites. C'est le rôle de :

– la superoxyde-dismutase (SOD) qui catalyse la réaction



– des peroxydases



– de la catalase



Toutes les bactéries aérobies strictes ou facultatives ont une superoxyde-dismutase. Les espèces ne possédant pas de catalase sont anaérobies ou anaérobies préférentielles.

Bactéries	Enzymes respiratoires	SOD	Catalase	Peroxydase
Bactéries aérobies strictes (<i>Pseudomonas</i> par ex.)		+	+	+
Bactéries aérobies facultatives (<i>E. coli</i> par ex.)		+	+	+
Bactéries anaérobies préférentielles (streptococoques par ex.)		+	-	+
Bactéries anaérobies strictes (<i>Clostridium</i> par ex.)		-	-	+

Tableau 5 – Les enzymes respiratoires

4.3. Métabolisme glucidique

La plupart des glucides peuvent être transformés en glucose par les bactéries.

Le glucose peut, chez les micro-organismes, être dégradé selon plusieurs voies fonctionnant, en général, en parallèle.

Au cours de ces transformations, certains métabolites intermédiaires sont oxydés et alimentent en protons et électrons la chaîne respiratoire ou subissent des phosphorylations au niveau du substrat. D'autres sont transformés en biomolécules utilisées pour diverses voies de biosynthèses.

Le catabolisme du glucose joue chez les bactéries chimio-organotrophes ce double rôle : source de substrats oxydables, source de métabolites alimentant les chaînes de biosynthèses.

4.3.1. Les voies du métabolisme oxydatif du glucose

4.3.1.1. La voie « classique » de la glycolyse et du cycle de Krebs

• Premier temps : la glycolyse (ou voie d'Emden et Meyerhoff)

Analyse de la figure 18 (page 56)

Dans un premier temps, une molécule de glucose est transformée en deux molécules d'acide pyruvique. Cette voie est appelée glycolyse.

Au cours de cette transformation, sont produites deux molécules de NADH, H⁺.

À noter aussi deux phosphorylations au niveau du substrat : 4 molécules d'ATP sont ainsi produites auxquelles il faut retrancher 2 molécules consommées.

Bilan



• Deuxième temps : la dégradation aérobie du pyruvate

Analyse de la figure 19 (page 57)

Le pyruvate subit une décarboxylation oxydative et une déshydrogénation pour donner l'acétylcoenzyme A (« acétate actif » car uni au coenzyme A par une liaison riche en énergie).

Au cours de cette réaction est produit une molécule de NADH, H⁺.

D'autres substances que le glucose peuvent être oxydées par cette voie : les acides gras sont dégradés en acétylcoenzyme A, les acides aminés peuvent par des réactions de transamination rejoindre le cycle de Krebs. Inversement, les métabolites du glucose peuvent servir à produire ces substances.

L'acétylcoenzyme A se combine à une molécule d'oxaloacétate pour donner une molécule de citrate.

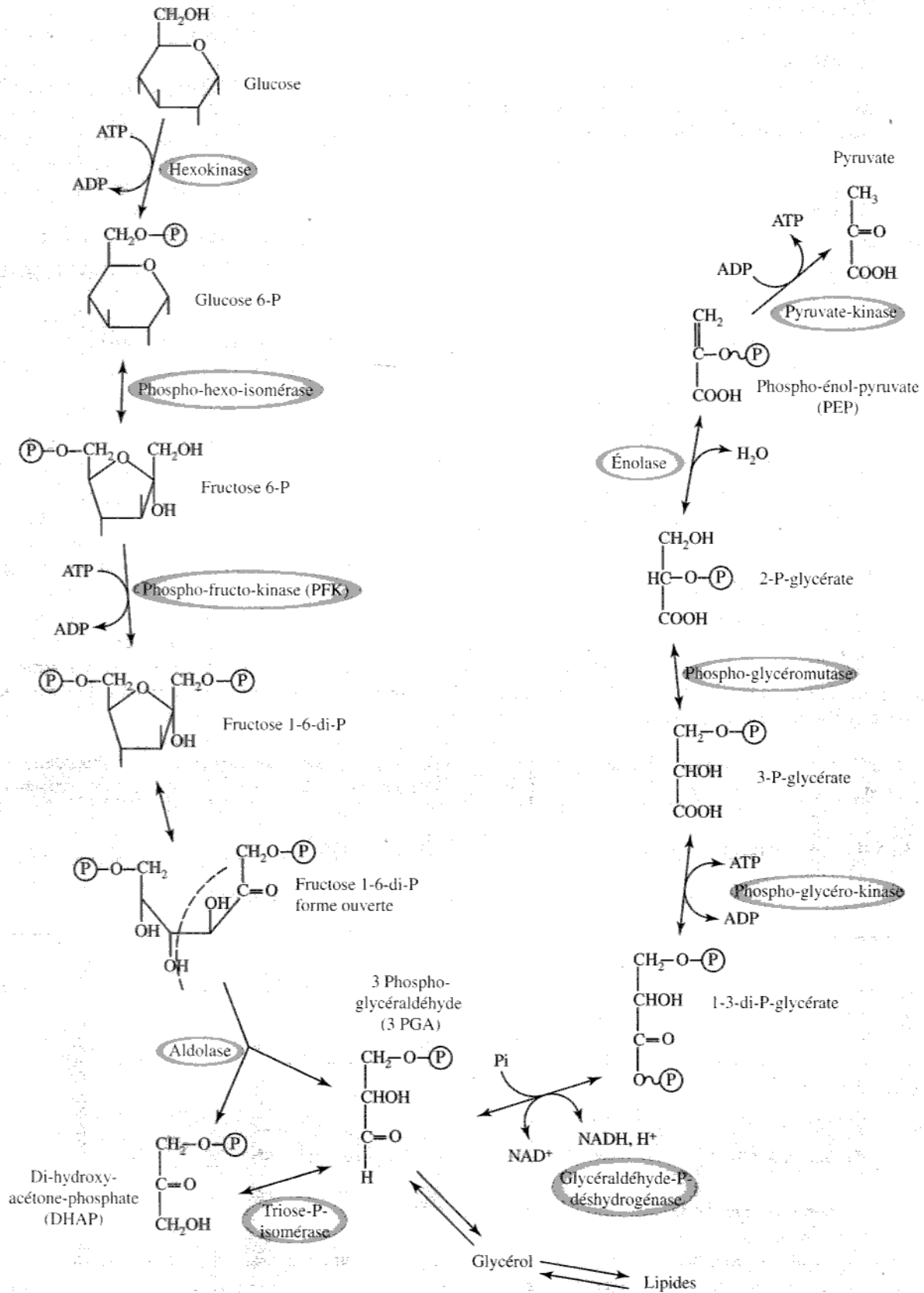


Fig. 18 - La glycolyse

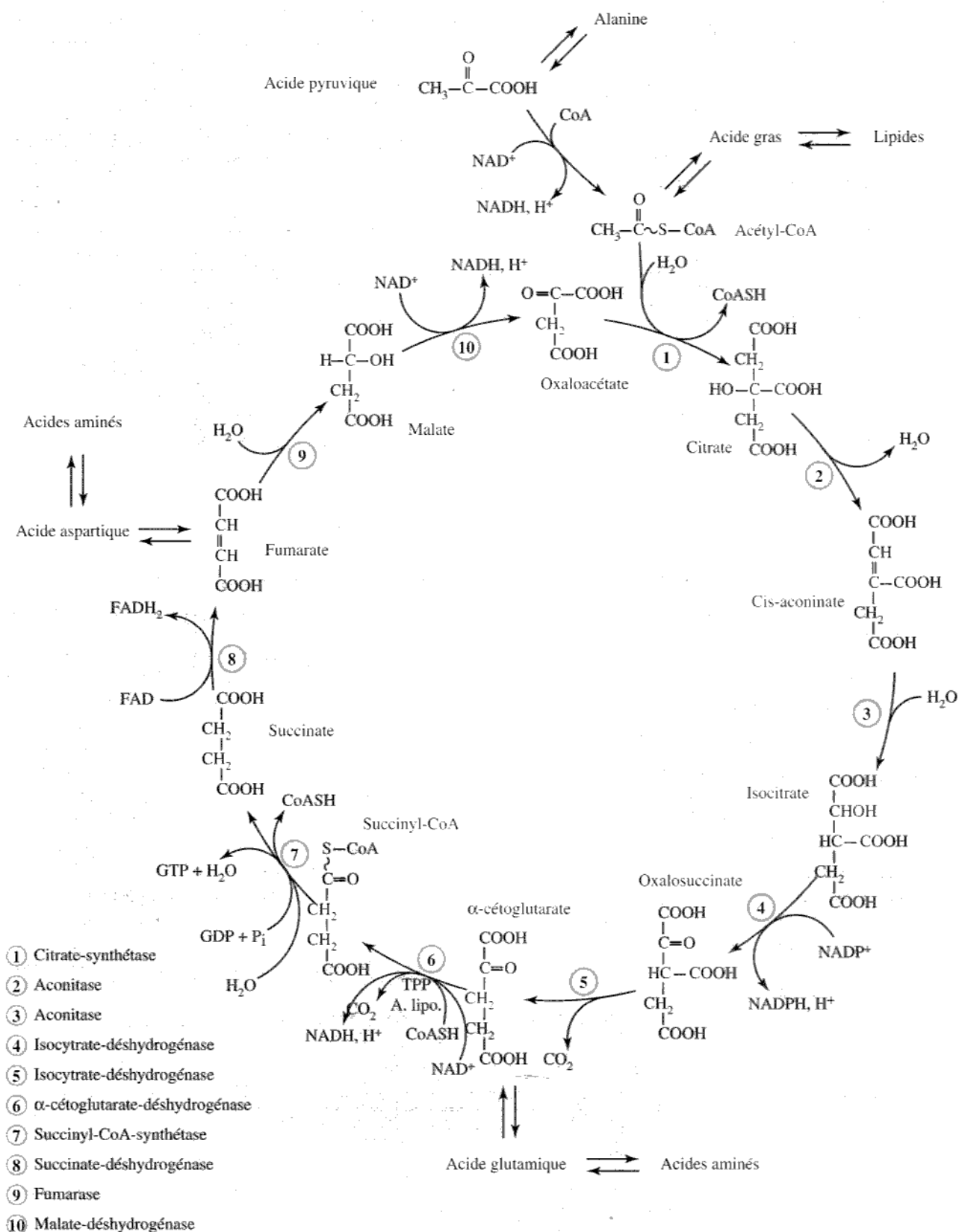


Fig. 19 – Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs représente l'ensemble des réactions qui, à partir du citrate, conduisent à recycler l'oxaloacétate.

Chaque tour du cycle de Krebs correspond donc à la dégradation d'une molécule d'acétate, le cycle étant approvisionné en acétate par la glycolyse. Les deux carbones de l'acétate sont oxydés en CO₂, ses hydrogènes passent sur des coenzymes pyridiniques ou flaviniques pour donner du NADH, H⁺, du NADPH, H⁺ ou du FADH₂.

Il y a quatre substrats oxydables parmi les intermédiaires du cycle de Krebs. Leur oxydation conduit à la production de paires d'hydrogène sous forme de NADH, H⁺, NADPH, H⁺, FADH₂, qui alimentent la chaîne respiratoire ou satisfont les besoins en hydrogène des chaînes de biosynthèses (cas du NADPH, H⁺).

L'hydrogène transféré sur ces coenzymes provient soit de l'acétate, soit de l'eau prélevée par le cycle.

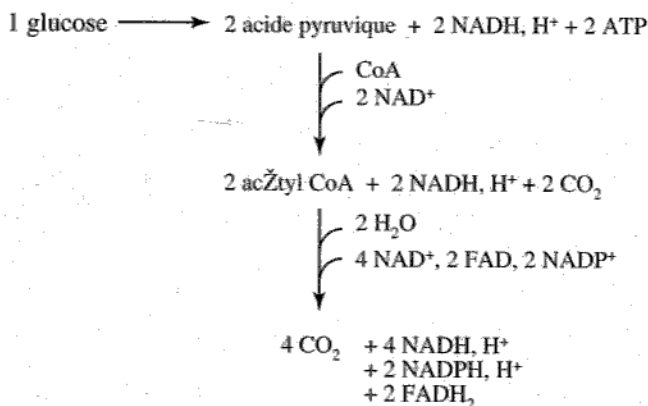


Fig. 20 – Résumé du catabolisme aérobie du glucose (voie classique)

Une molécule de glucose produit donc 12 paires d'hydrogène sous forme de coenzymes réduits. Les coenzymes réduits alimentent la chaîne respiratoire; l'oxygène étant l'accepteur final d'électrons, on peut écrire de façon globale :



Au bilan général, on retrouve bien :



ce qui est l'équation de Lavoisier!

4.3.1.2. Une alternative à la glycolyse : le shunt de l'hexose monophosphate

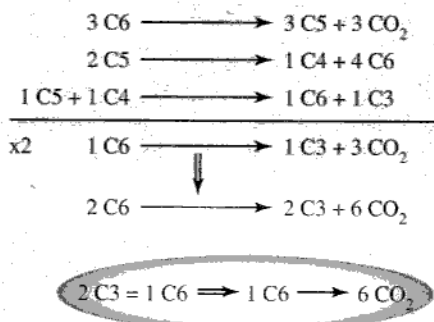
Analyse de la figure 21 (page 59)

Le glucose phosphorylé sur son carbone 6 est directement oxydé en 6 phosphogluconate.

La décarboxylation du 6 phosphogluconate conduit à un pentose : le ribulose 5 phosphate. Ce dernier peut être isomérisé :

- soit en ribose 5 phosphate utilisable pour différentes synthèses : acides nucléiques, NAD⁺, NADP⁺, FAD, FMN... ;
- soit en xylulose 5 phosphate.

À partir de ces deux pentoses, des transferts de fragments à 2 ou 3 atomes de carbone conduisent à différentes interconversions dont le bilan carboné peut être ainsi résumé :



Il s'agit bien d'une oxydation complète du glucose en CO₂.

Les ions hydrogène arrachés aux différents substrats oxydables sont transférés sur du NADPH, H⁺.

De nombreuses bactéries, levures ou moisissures utilisent cette voie : *Pseudomonas*, entérobactéries, *Torulopsis*, *Aspergillus*...

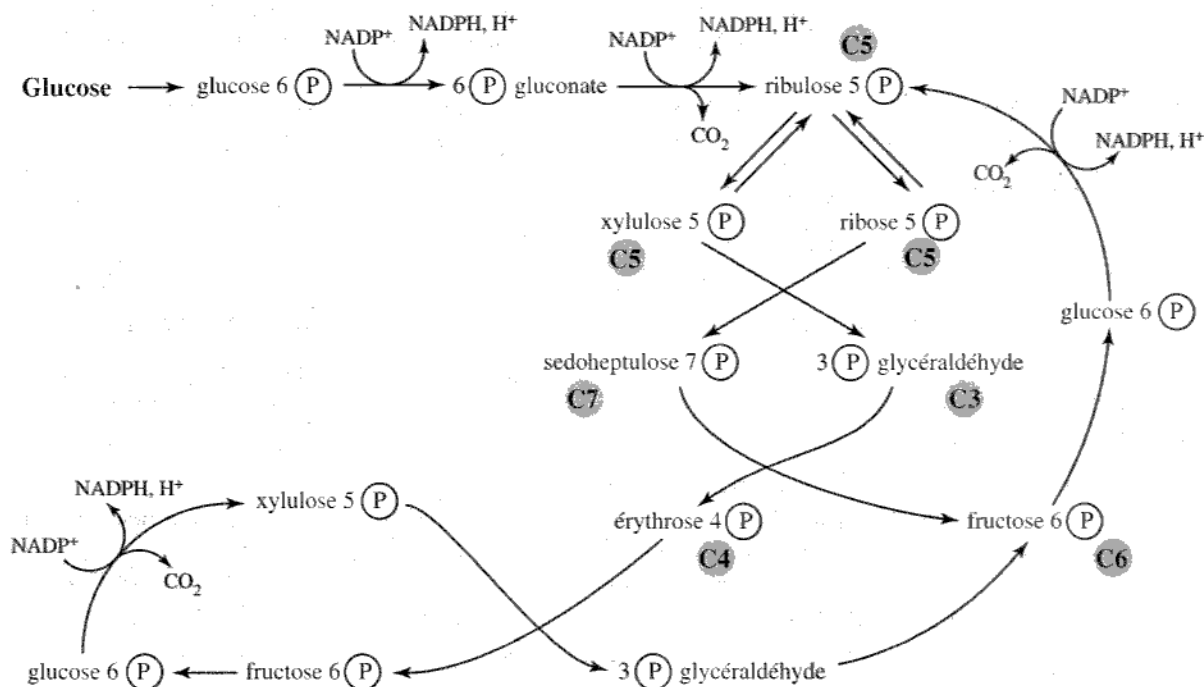


Fig. 21 – Le shunt de l'hexose monophosphate

4.3.1.3. Rôle du catabolisme aérobie du glucose dans la production d'énergie - Bilan énergétique

• Par la voie de la glycolyse et du cycle de Krebs

Prenons l'exemple d'*Escherichia coli*. Nous avons vu, au cours de l'étude du métabolisme énergétique, que l'entrée d'une paire d'hydrogène dans la chaîne respiratoire permet l'expulsion de $4H^+$ si l'hydrogène est supporté par le $NADH^+$, $2H^+$ dans le cas du $FADH_2$.

La dégradation d'une molécule de glucose par la voie du cycle de Krebs permet donc l'expulsion de $(10 \times 4) + (2 \times 2) = 44 H^+$.

On doit tenir compte de la production par phosphorylation au niveau du substrat de 2 GTP et 2 ATP (2 ATP consommés pour 4 ATP et 2 GTP produits).

Il est classiquement admis que, chez *E. Coli*, l'ATP-synthétase utilise le flux entrant de $3 H^+$ pour produire 1 ATP. Les 2 GTP et 2 ATP sont donc équivalents à $4 \times 3 = 12 H^+$.

Au total, la dégradation d'une molécule de glucose permet donc l'expulsion de $56 H^+$, ce qui représente $56 \times 18 = 1\,008$ kilojoules. L'oxydation d'une molécule de glucose libérant $2\,875 \text{ kJoules.mole}^{-1}$, le rendement est de l'ordre de 35 %.

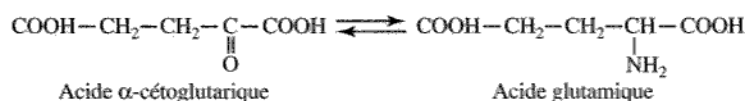
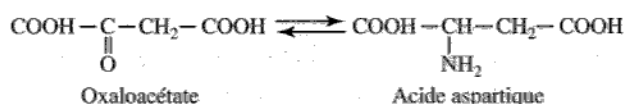
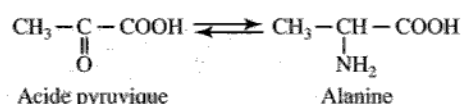
• Par le shunt de l'hexose monophosphate

L'oxydation complète d'une molécule de glucose par cette voie libère 12 $NADPH, H^+$, donc permet l'expulsion de $48 H^+$.

4.3.1.4. Catabolisme aérobie du glucose et biosynthèses

La glycolyse et le cycle de Krebs fournissent diverses substances qui peuvent être prélevées pour alimenter les biosynthèses. Quelques exemples :

- les trioses phosphates de la glycolyse peuvent être transformés en glycérol (inversement le glycérol peut alimenter la glycolyse);
- l'acétylcoenzyme A est le point de départ de la synthèse des acides gras (inversement les acides gras peuvent être oxydés en acétyl CoA);
- plusieurs acides α -cétoniques de la glycolyse et du cycle de Krebs peuvent être transformés par amination ou transamination en acides aminés :



Le shunt de l'hexose monophosphate fournit différents hexoses et pentoses utiles pour les biosynthèses. C'est le cas du ribose qui entre dans la constitution d'acides nucléiques et des coenzymes à structure nucléotidique (NAD⁺, NADP⁺, FAD, FMN...).

Rappelons que cette voie produit du NADPH, H⁺ qui est le coenzyme de la plupart des réactions d'hydrogénation au cours des biosynthèses.

4.3.2. Les voies du métabolisme fermentatif du glucose

4.3.2.1. Fermentations utilisant la voie de la glycolyse

Elles possèdent avec la voie aérobie un tronc commun : la glycolyse.



Les coenzymes pyridiniques réduits doivent être réoxydés pour que le processus se poursuive. Le métabolisme étant anaérobie et n'utilisant pas les chaînes cytochromiques, les accepteurs finaux d'hydrogène sont le pyruvate ou des métabolites issus de la transformation du pyruvate.

• Le cas le plus simple : la fermentation homolactique

Elle est pratiquée par de nombreuses espèces de streptocoques, de *Lactobacillus* et de *Bacillus*. C'est la fermentation principale de la transformation du lait en yaourt ou en fromage frais.

L'acide pyruvique joue le rôle d'accepteur d'hydrogène :



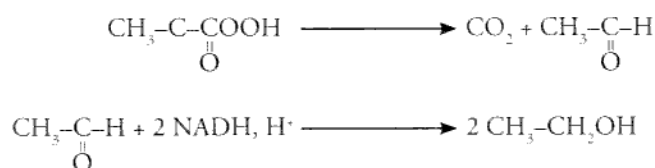
Bilan



On remarque que l'ATP produite par phosphorylation au niveau du substrat est la seule source d'énergie.

• La fermentation alcoolique

Les NADH, H⁺ produits au cours de la glycolyse sont réoxydés par l'éthanal issu de la décarboxylation du pyruvate.



Bilan



La fermentation alcoolique est un exemple de fermentation s'accompagnant de production de gaz (ici le dioxyde de carbone).

Elle est pratiquée par de nombreuses levures. Elle est à la base de la fabrication du pain (la levée de la pâte est due au dégagement de CO₂) et de nombreuses boissons alcoolisées.

• D'autres fermentations plus complexes

– Fermentations acides mixtes des entérobactéries VP– (fig. 22)

Ces fermentations aboutissent à plusieurs acides organiques : acide lactique, acide succinique, acide acétique, à de l'éthanol, et produisent des gaz (ici CO₂ et H₂). Le milieu est fortement acidifié.

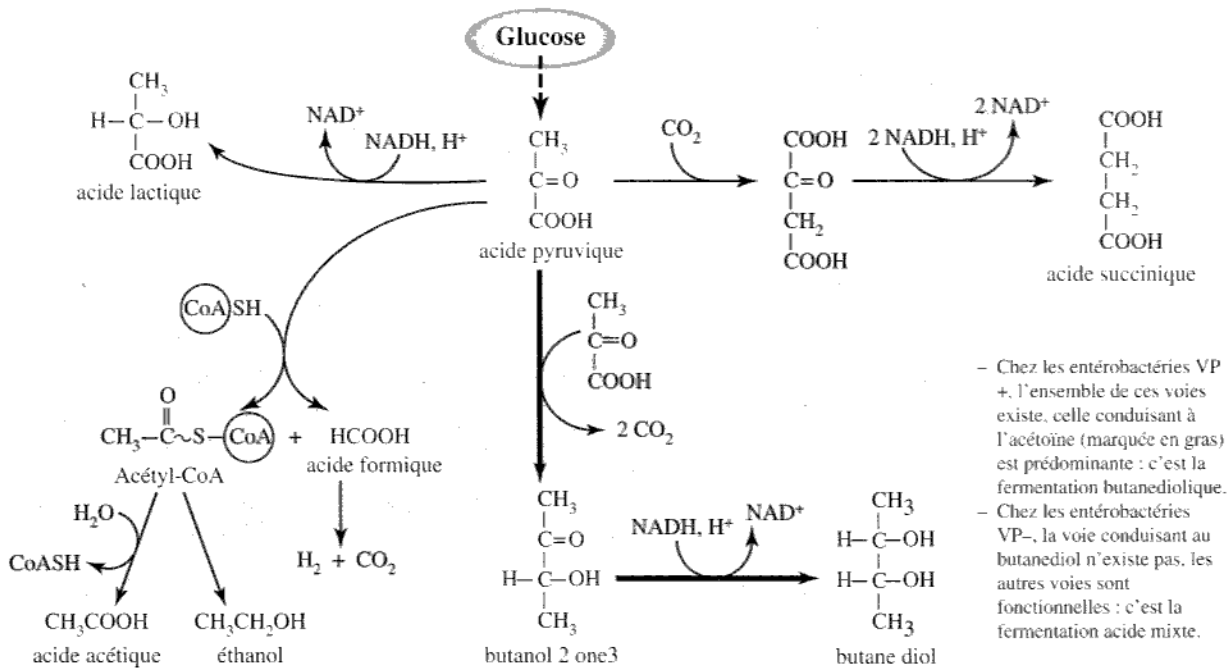
– Fermentation butanediolique des entérobactéries VP+ (fig. 22)

La fermentation butanediolique conduit à des quantités moins importantes d'acides organiques, une proportion non négligeable du pyruvate étant transformée en un produit neutre : le butanol 2 one 3 (jadis appelé acétoïne), en général réduite en butanediol.

La réaction de Voges Proskauer (VP) consiste à mettre en évidence, par une réaction colorée, le butanediol et l'acétoïne.

Cette fermentation est pratiquée par les *Serratia*, les *Enterobacter* et les *Klebsiella*, mais aussi certains vibrions, quelques souches de *Proteus mirabilis*, certains streptocoques...

Elle acidifie moins le milieu que la précédente. Elle produit aussi des gaz (CO₂ et H₂).



- Chez les entérobactéries VP+, l'ensemble de ces voies existe, celle conduisant à l'acétoïne (marquée en gras) est prédominante : c'est la fermentation butanediolique.
- Chez les entérobactéries VP-, la voie conduisant au butanediol n'existe pas, les autres voies sont fonctionnelles : c'est la fermentation acide mixte.

Fig. 22 – Fermentation des entérobactéries

– Fermentations des bactéries anaérobies strictes (fig. 23)

Elles conduisent à des acides organiques, des alcools, des cétones en C₄ et en C₃ avec production de gaz et acidification du milieu. La diversité des produits en fonction des souches est telle que leur analyse par chromatographie en phase gazeuse est utilisée pour les identifier.

Clostridium perfringens pratique la fermentation butyrique avec production d'acide butyrique, d'acide acétique et de gaz (H₂, CO₂).

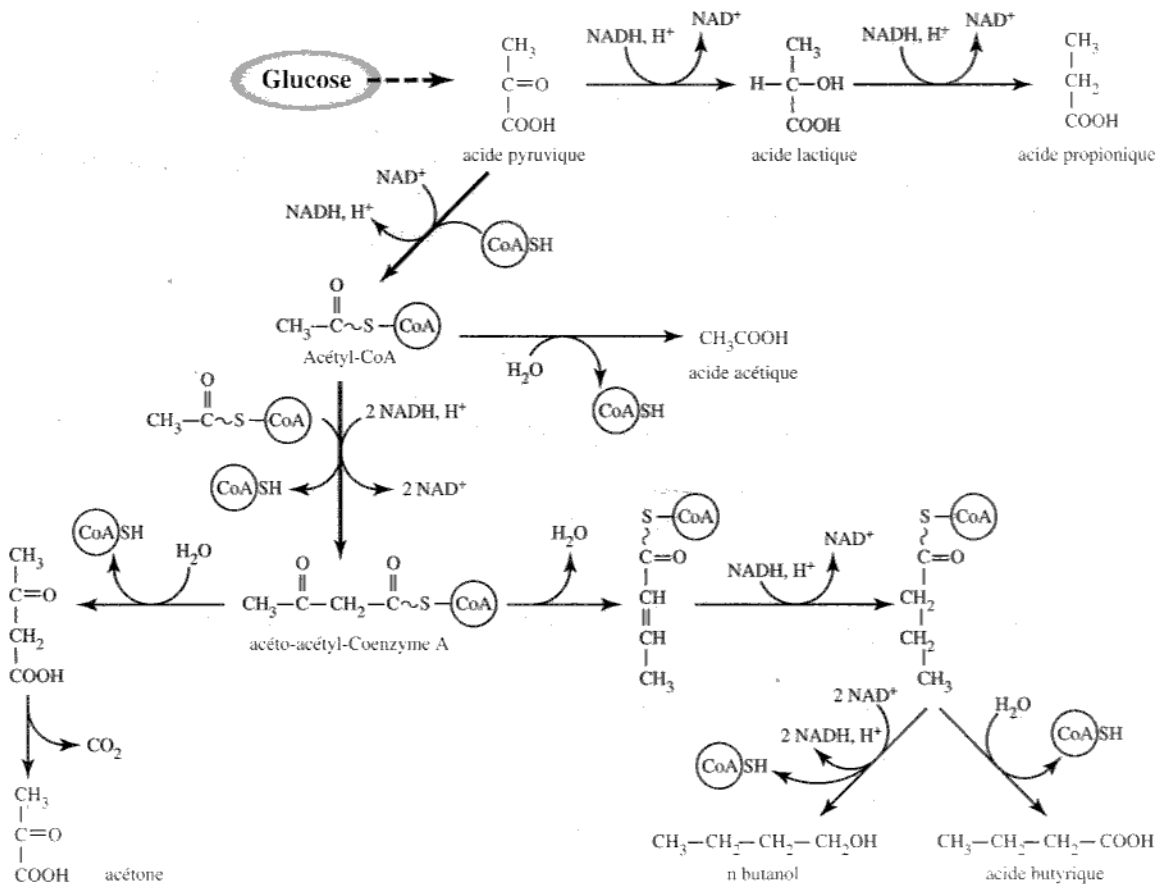


Fig. 23 – Fermentation des *Clostridium*

4.3.2.2. Un exemple de fermentation utilisant une voie autre que la glycolyse : la fermentation hétérolactique ou voie de Dickens et Horecker (fig. 24)

Elle porte aussi le nom de voie des pentoses phosphates. Elle possède, en commun avec le shunt des hexoses phosphates, les réactions transformant le glucose en pentoses : ribose 5 phosphate et xylulose 5 phosphate.

Le xylulose 5 phosphate est ensuite métabolisé différemment, il est scindé en :

- 1 composé en C₃ : le 3 phosphoglyceraldéhyde qui est transformé en lactate ;
- 1 composé en C₂ : l'acétylphosphate transformé en éthanol.

Notons que le 3 phosphoglyceraldéhyde peut rejoindre la glycolyse et la voie aérobie si les conditions le permettent.

La fermentation hétérolactique produit du gaz, elle est moins acidifiante que la fermentation homolactique.

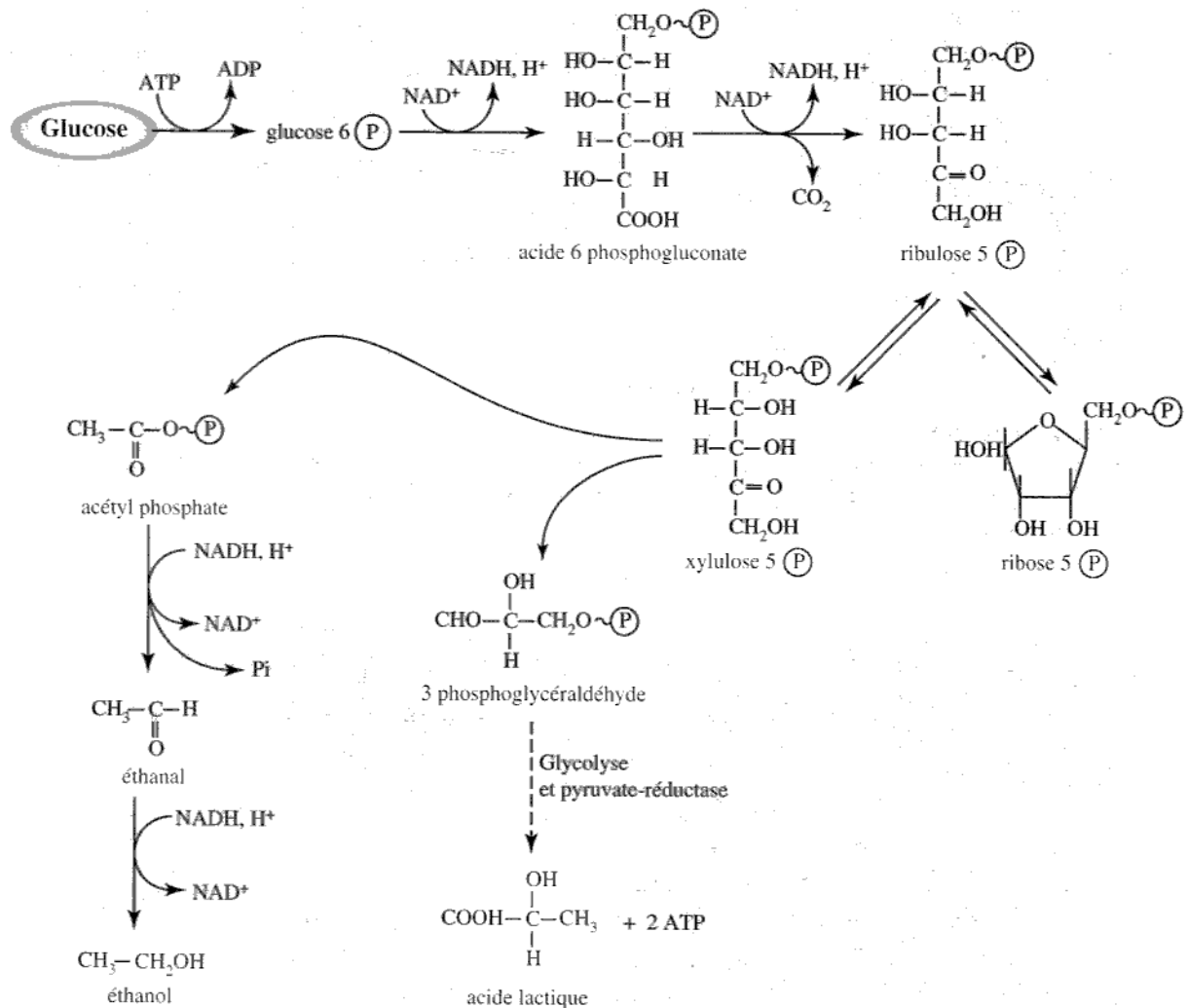


Fig. 24 – Fermentation hétérolactique par la voie des pentoses phosphates

4.3.3. Catabolisme des autres glucides

4.3.3.1. Les oses

• 1^{er} cas

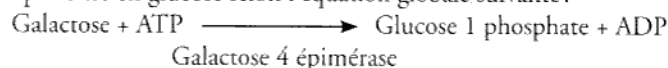
Ils peuvent intégrer directement une des voies du catabolisme du glucose : c'est le cas du fructose, du ribose, du xylulose...

• 2^e cas

Ils sont isomérisés en glucose par l'action d'isomérases.

EXEMPLE

Le galactose est épimérisé en glucose selon l'équation globale suivante :



Le glucose 1(P) est lui-même transformé en glucose 6(P) qui rejoint la glycolyse.

4.3.3.2. Les diosides

Les bactéries produisent des enzymes catalysant l'hydrolyse de différents diosides naturels.

- Le **lactose** est transformé sous l'action de la β -galactosidase en glucose et galactose, ce dernier peut rejoindre, après isomérisation, la voie de la glycolyse (ou du shunt des hexoses phosphates).
- De même, la maltase et l'invertase catalysent respectivement l'hydrolyse du **maltose** et du **saccharose** (en glucose pour le premier, glucose et fructose pour le second).

Ces enzymes sont presque toujours induites, c'est-à-dire qu'elles ne sont produites que lorsque la bactérie est en présence de son substrat.

4.3.3.3. Les polyosides

- L'**amidon** est dégradé en glucose par plusieurs amylases (*Bacillus*, *Clostridium*, *Aspergillus*...).
- Les bactéries cellulolytiques (*Bacillus*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, moisissures) sécrètent des cellulases. Ces bactéries ont une grande importance dans la nutrition des bovins dont la **cellulose** est le principal aliment.

4.3.3.4. Les hétérosides

- Les bactéries hydrolysant la **salicine** la transforment en acide salicylique et glucose.
- Celles hydrolysant l'**esculine** forment du glucose et de l'esculétol.

4.3.3.5. Les dérivés d'oses

- Des **hexitols** comme le mannitol, le dulcitol et le sorbitol, peuvent être transformés respectivement en mannose, galactose, sorbose.
- Un **méthyleose** comme le rhamnose peut donner du mannose.

On pourrait, dans chaque catégorie, multiplier les exemples.

La capacité d'une bactérie à utiliser un glucide est donc liée à son aptitude à produire, à partir de ce substrat, du glucose ou un ose pouvant intégrer une des voies du catabolisme glucidique.

Ces capacités sont variables selon les souches, c'est pourquoi cette étude au laboratoire présente un grand intérêt taxonomique.

4.4. Métabolisme protidique

4.4.1. Présentation – Vue d'ensemble

Ainsi que nous l'avons vu dans le paragraphe 1 consacré à la nutrition, les bactéries puisent dans leur milieu de culture (qui peut être le milieu naturel ou un aliment) les nutriments qui leur sont utiles pour synthétiser leur matière vivante. Cependant, seules les molécules relativement simples peuvent traverser la membrane. Les macromolécules (polyosides, protéines, lipides) sont donc préalablement hydrolysées par l'action d'exoenzymes produites par la bactérie et rejetées soit dans le milieu, soit dans son espace périplasmique.

Une viande ou un caillé, laissés sans précautions à une température modérée, sont plus ou moins rapidement transformés. Ces transformations vont de pair avec une prolifération microbienne. Les constituants pondéralement les plus importants étant des protéines, la flore qui se développe contient des micro-organismes protéolytiques.

L'expérience montre que les micro-organismes se développent plus vite en milieu de culture (eau peptonée par exemple) que sur un substrat naturel. Dans ce dernier cas, en effet, la mobilisation des acides aminés par la cellule se fait en deux temps :

- ① hydrolyse du substrat (protéases) ;
- ② pénétration des acides aminés (perméases).

Les bactéries cultivées *in vitro* shuntent la voie 1 (sauf si le milieu contient des macromolécules de nature protéique, par exemple des peptones peu dégradées).

À l'intérieur de la cellule, les acides aminés sont utilisés pour la synthèse des protéines ou sont dégradés.

Le métabolisme protidique des bactéries peut donc être envisagé sous plusieurs aspects :

- l'étude de l'activité protéolytique globale ;
- celle du métabolisme des acides aminés ;
- celle du devenir d'autres dérivés de nature protidique comme l'urée.

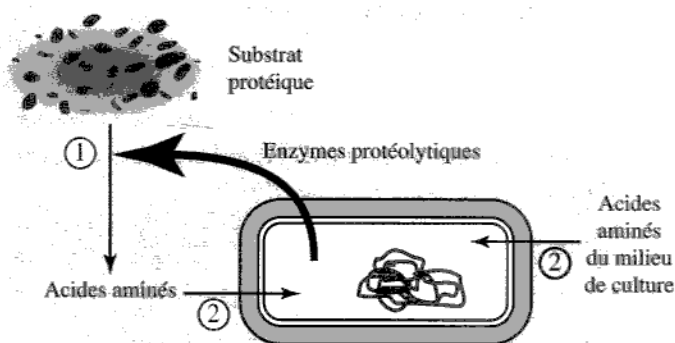


Fig. 25 – Utilisation d'un substrat protéique par les bactéries

4.4.2. Hydrolyse des substrats protéiques

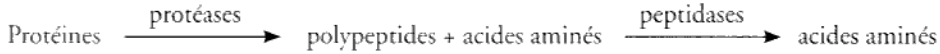
4.4.2.1. Protéases

Les bactéries protéolytiques élaborent des **protéases**. Ces enzymes peuvent, selon le cas, agir en :
 – **exopeptidases** qui séparent un à un les acides aminés terminaux à partir de l'extrémité C ou N terminale ;
 – **endopeptidases** qui hydrolysent la liaison peptidique en certains points déterminés par leur spécificité.

Clostridium histolyticum produit 4 protéines différentes, certains *Bacillus* très protéolytiques excrètent jusqu'à un gramme par litre de protéases dans le milieu. Le premier est responsable des myonécroses (liquéfaction, digestion du muscle), les seconds provoquent des altérations importantes des aliments riches en protéines.

4.4.2.2. Peptidases

L'action des protéases conduit à un mélange d'acides aminés et de peptides. Les peptidases permettent de compléter l'hydrolyse et d'obtenir exclusivement des acides aminés. La plupart des micro-organismes possèdent des peptidases dont la spécificité varie selon les acides aminés constitutifs.



4.4.3. Transformation des acides aminés

Les acides aminés peuvent subir soit une décarboxylation, soit une désamination. D'autres transformations sont possibles.

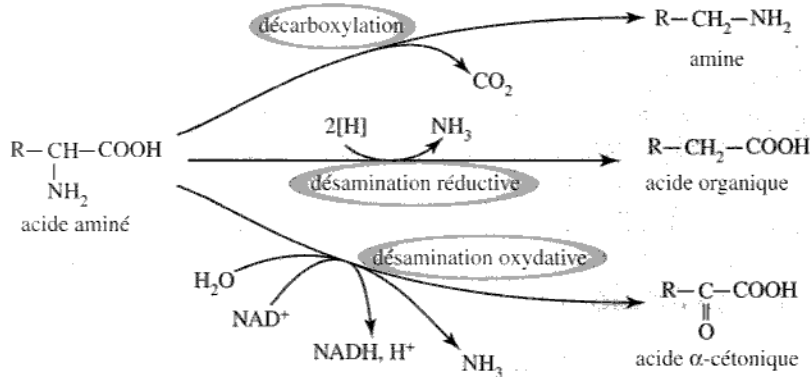


Fig. 26 – Métabolisme des acides aminés

4.4.3.1. Décarboxylations

Elles sont catalysées par des décarboxylases spécifiques de chaque acide aminé. Les plus recherchées au laboratoire sont :

- la lysine-décarboxylase (LDC)



- l'ornithine-décarboxylase (ODC)



- l'arginine-dihydrolase (ADH) et l'arginine-décarboxylase (ADC)

– L'ADH catalyse les réactions (fig. 27)

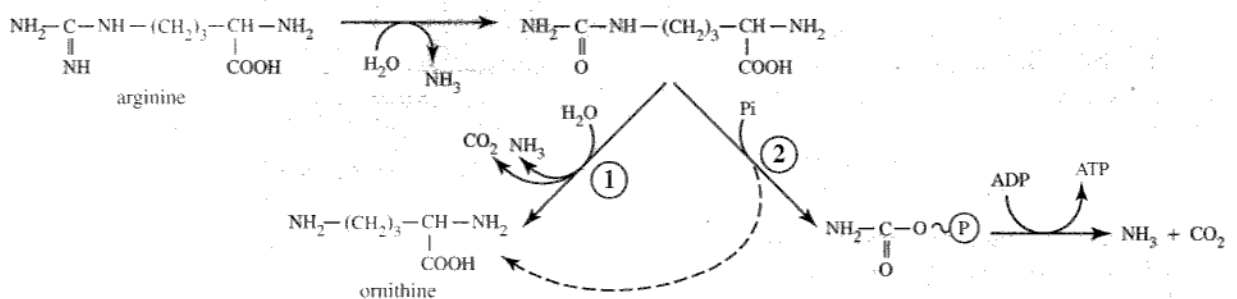


Fig. 27 – Réactions catalysées par l'ADH

Quelle que soit la voie suivie, la dégradation de l'arginine produit donc de l'ornithine. Cette dernière peut être catabolisée si la bactérie possède l'ODC.

La voie ② permet la production d'énergie. Cela explique que des *Pseudomonas* (bactéries aérobies strictes) ADH + puissent cultiver en anaérobiose dans un milieu contenant de l'arginine.

– L'ADC conduit à l'agmatine.

- L'histidine-décarboxylase (HDC)

Elle transforme l'histidine en histamine. Ce composé est toxique. Les altérations de la chair de poissons riches en histidine peuvent être à l'origine d'intoxications (choc histaminique).

4.4.3.2. Désamination

L'élimination du groupement aminé peut être réalisée par plusieurs voies métaboliques.

- La désamination oxydative

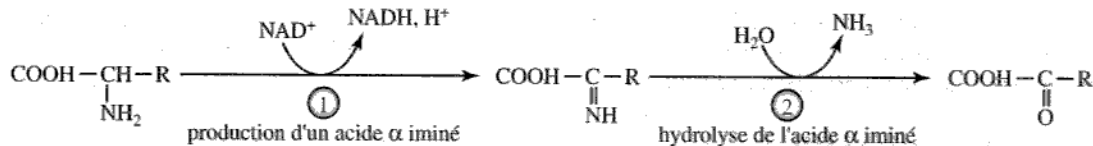
– catalysée par des aminoacides-déshydrogénases autoxydables à coenzymes flaviniques (FAD)



Le peroxyde d'hydrogène, toxique, doit être détruit par l'action d'une catalase ou d'une peroxydase.

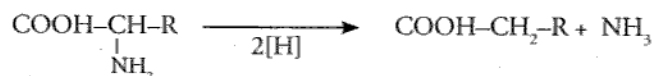
– catalysée par des aminoacides-déshydrogénases fonctionnant avec du NAD⁺

La désamination se déroule alors en deux temps :



La phénylalanine-désaminase (PDA ou APP) et la tryptophane-désaminase (TDA) fonctionnent sur ce principe.

- La désamination réductive



On obtient un acide organique (désamination pratiquée par les *Clostridium*).

- La désamination désaturante

EXEMPLE : L'ASPARTATE



donne du fumarate qui rejoint le métabolisme des glucides (chez *E. coli* par exemple).

4.4. D'autres transformations des acides aminés

Certains acides aminés peuvent être métabolisés selon une voie particulière.

C'est le cas du tryptophane qui peut être scindé en alanine et indole par les bactéries dites indologènes (indole+).

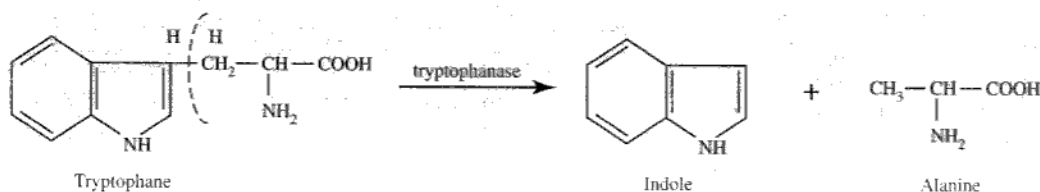


Fig. 28 – Réaction catalysée par la tryptophanase

Les acides aminés sulfurés peuvent être métabolisés avec élimination de leur groupement SH, sous forme de sulfure d'hydrogène H₂S.

5. Les rapports entre les bactéries et les organismes hôtes

Selon leur nature et les conditions de milieu, les micro-organismes peuvent entretenir avec leurs hôtes trois types de rapports. Dans certains cas, les rapports hôtes/micro-organismes sont équilibrés, chaque partenaire tirant de leur association un bénéfice égal. Il s'agit d'une symbiose.

D'autres, les plus nombreux, vivent aux dépens d'un hôte, c'est la définition du parasitisme.

Le parasitisme microbien peut, lui-même, se présenter sous deux formes :

- les micro-organismes n'exercent aucun effet de nuisance chez l'hôte : ils sont dits commensaux ;
- leur présence et leur multiplication sont à l'origine de maladies (les infections), il s'agit de micro-organismes pathogènes.

Nous verrons, dans la suite de cet ouvrage, que la limite entre commensaux et pathogènes n'est pas toujours très nette et est largement tributaire du bon fonctionnement des défenses de l'organisme.

5.1. Les flores commensales

De très nombreux genres et espèces bactériennes vivent sur la peau et sur les muqueuses des cavités naturelles de l'homme et des animaux, constituant les flores commensales de ces revêtements. On distingue généralement :

- les flores commensales permanentes dites flores résidentes qui ont tendance à se rétablir chaque fois qu'elles sont perturbées ;
- les flores transitoires, constituées de bactéries peu nombreuses, non pathogènes en présence de la flore résidente, mais qui peuvent proliférer et devenir pathogènes lorsque la flore résidente est perturbée.

La composition de ces flores dépend des conditions de milieu.

5.1.1. La flore de la peau

Elle est constituée de bactéries lipophiles qui se développent aux dépens des sécrétions sébacées et de la kératine. Ce sont, presque exclusivement, des bactéries à Gram+ : microcoques, staphylocoques, *Bacillus*, corynébactéries.

Nous en ferons une étude plus détaillée dans la suite de cet ouvrage.

5.1.2. La flore du vagin

Le facteur de sélection est ici l'acidité. De la puberté à la ménopause, elle est dominée par un seul germe : *Lactobacillus acidophilus*.

5.1.3. La flore des voies digestives

Le tube digestif humain héberge 10^{14} bactéries, essentiellement dans le côlon. On a pu y dénombrer plus de 400 espèces associées pour former un écosystème dont la composition, relativement stable pour un même individu, résulte des interactions dans le tube digestif, entre les constituants vivants (bactéries) et les constituants inertes (nutriments et sécrétions).

5.1.3.1. Profil général de la flore de l'appareil digestif

Les bactéries de la flore endogène sont celles qui trouvent dans le tube digestif, stérile à la naissance, les conditions propices à leur implantation. Sous l'influence de facteurs essentiellement exogènes (environnement, alimentation), la flore du nouveau-né, simple et relativement peu abondante, évolue vers une flore complexe et stable à partir de l'âge de 1 an. Dans un segment donné du tube digestif, les bactéries sont localisées soit dans la lumière, soit, pour la plupart, dans la couche de mucus recouvrant l'épithélium intestinal ; une minorité sont attachées à la muqueuse.

De l'estomac au côlon, le nombre de bactéries va en croissant ainsi que la proportion de bactéries anaérobies strictes.

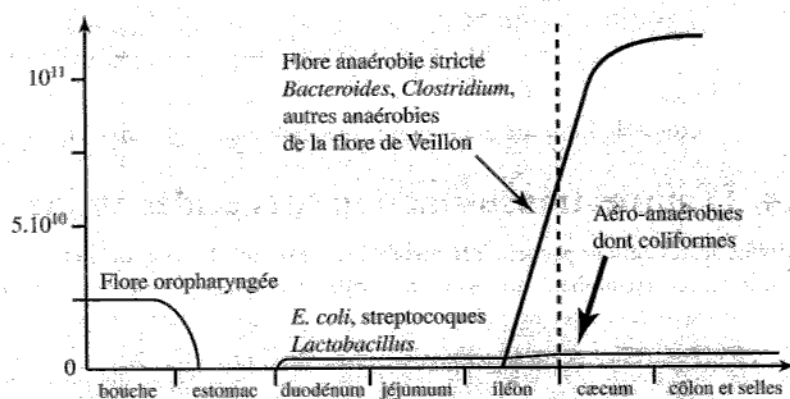


Fig. 29 – Schéma récapitulatif de la flore de l'appareil digestif

5.1.3.2. Composition de la flore du côlon

L'application des techniques de biologie moléculaire (séquençage des ARN ribosomaux 16S, utilisation des sondes nucléiques) permet aujourd'hui une bonne connaissance de la composition qualitative de la flore du côlon gauche.

On distingue, en fonction de l'importance de leur population :

- des espèces dites **dominantes**, car présentes à des concentrations de l'ordre de 10^9 à 10^{11} par gramme de selle ;
- des espèces **sous-dominantes** que l'on trouve à des concentrations de 10^6 à 10^8 par gramme.

Les bactéries anaérobies sont largement prédominantes : 99 % du nombre total de bactéries et 40 % du poids sec.

Parmi ces bactéries, certaines sont recherchées, au cours des analyses alimentaires, comme témoins de contamination fécale : *Escherichia coli*, les entérobactéries coliformes, les streptocoques fécaux et les *Clostridium* sulfite-réducteurs.

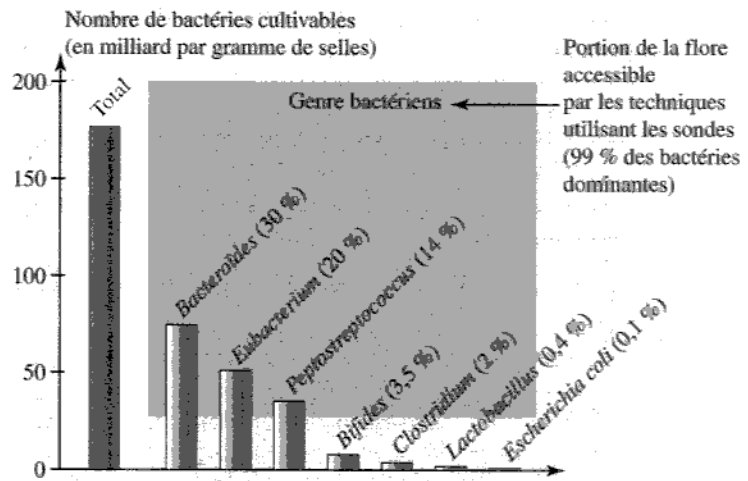


Fig. 30 – Composition qualitative et quantitative de la flore du côlon

5.1.3.3. Rôle de la flore intestinale

Les bactéries intestinales exercent une activité métabolique considérable dont une partie profite à leur hôte. Elles dégradent différents substrats exogènes (cellulose, acides gras, acides aminés...) et endogènes (urée, bilirubine, acides biliaires...) ainsi que des débris cellulaires en provenance du côlon.

Cependant, leur rôle principal et le moins discuté est l'effet de barrière microbienne qu'elles opposent à l'implantation de bactéries exogènes, soit en totalité, soit partiellement, en limitant leur nombre au niveau d'une population sous-dominante.

5.1.4. La flore oropharyngée

Elle est, aussi, très abondante et diversifiée. Sa composition dépend de la zone anatomique considérée. Au niveau de la bouche, on trouve essentiellement des streptocoques non groupables : *Streptococcus salivarius*, *S. mitis*, *S. sanguis*...

Le pharynx est peuplé de *Neisseria*. Le tartre dentaire et les espaces interdentaires contiennent de nombreuses espèces anaérobies, des *Haemophilus*, des streptocoques et des *Lactobacillus*. *Haemophilus parainfluenzae* est présent à tous les niveaux de la sphère oropharyngée. Signalons, enfin, la présence de staphylocoques et de microcoques dans les fosses nasales.

5.1.5. Le cas particulier des porteurs sains de bactéries pathogènes

Chez un petit nombre d'individus, il est possible d'isoler des bactéries pathogènes, en général en petit nombre, au sein d'une flore commensale, sans qu'aucun signe d'infection ne puisse être observé. On parle de **porteurs sains**.

Ce portage est soit **transitoire** et coïncide avec une période de convalescence, soit **permanent**, les germes ayant trouvé un équilibre avec les défenses de l'organisme et donc leur place dans l'écologie locale.

Ce phénomène intéresse de très près l'hygiène alimentaire car les porteurs sains sont susceptibles de contaminer les aliments soit au cours d'une manutention, soit par les projections salivaires. Citons :

- le portage de *Salmonella* au niveau des voies biliaires, les bactéries étant éliminées par les selles ;
- le portage nasal de *Staphylococcus aureus*, assez fréquent (30 à 40 %) ;
- le portage pharyngé de méningocoques (5 à 10 % de la population) ;
- au niveau de la gorge, le portage de *Streptococcus pyogenes* et de pneumocoques.

5.2. Bactéries et infections : pouvoir pathogène

5.2.1. Principales composantes du pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène des bactéries est déterminé par trois éléments principaux :

- leur **capacité à proliférer dans l'organisme** : c'est leur pouvoir invasif ou pouvoir de multiplication ;
- leur **capacité à sécréter des toxines** : c'est leur pouvoir toxique ;
- les **résistances opposées par l'organisme** (on parle aussi de terrain).

On peut schématiser ces données sous forme d'une équation (sans valeur mathématique, bien sûr) :

$$\text{pouvoir pathogène} = \frac{\text{pouvoir invasif} + \text{pouvoir toxique}}{\text{résistances de l'organisme}}$$

et envisager, sur leurs bases, plusieurs cas de figure.

- 1^{er} cas. bactéries dotées d'un pouvoir invasif important et d'un pouvoir toxique faible

EXEMPLES

Brucella, bacilles tuberculeux, *Salmonella*, les souches les plus virulentes de *Staphylococcus aureus*...

- 2^e cas. bactéries peu invasives, à pouvoir toxique élevé

EXEMPLES

Corynebacterium diphtheriae (diphthérie), *Clostridium tetani* (tétanos), *Clostridium botulinum* (botulisme)...

- 3^e cas. bactéries dotées à la fois d'un pouvoir invasif et d'un pouvoir toxique fort

EXEMPLES

Les *Clostridium* toxigènes agents de myonécroses, *Salmonella* Typhi...

L'ensemble de ces bactéries sont dites à pouvoir pathogène spécifique, car, introduites dans l'organisme, elles provoquent, chez la plupart des sujets non protégés, une pathologie bien précise et leur pouvoir pathogène s'exerce sur des terrains normaux.

- 4^e cas. bactéries peu invasives et peu ou pas toxiques

Elles ne peuvent engendrer d'infections qu'à l'occasion d'un affaiblissement des défenses de l'organisme. Elles sont dites opportunistes, peuplent nos muqueuses et notre environnement. Elles sont donc commensales sur terrain normal, pathogènes sur terrain affaibli.

Citons les *Pseudomonas*, les entérobactéries, les souches peu invasives de staphylocoques, *Acinetobacter*... En fait, la plupart des bactéries commensales peuvent proliférer sur terrain affaibli.

Les infections à germes opportunistes sont redoutées en milieu hospitalier: on parle, dans ce cas, d'infections nosocomiales.

5.2.2. Mécanismes de défense de l'organisme contre l'infection

5.2.2.1. La barrière cutanéomuqueuse

L'organisme est entièrement recouvert, à l'extérieur par la peau, côté organes par les muqueuses.

- La peau

Elle oppose aux bactéries une résistance presque toujours décisive, du fait de l'existence de plusieurs couches kératinisées difficilement dissociables par les bactéries et de la présence, à sa surface, de sécrétions sébacées douées d'activité bactéricide.

- Les muqueuses

Elles recouvrent les voies respiratoires, digestives et uro-génitales et s'opposent aux bactéries par des mécanismes différents.

– Au niveau de la muqueuse respiratoire

Un examen histologique de la muqueuse bronchique permet d'observer deux types de cellules importantes:

- les cellules épithéliales ciliées;
- les cellules à mucus.

Le battement des cils étale le mucus sur lequel les poussières sont piégées et permet leur remontée vers la trachée. On compare souvent ce dispositif à un tapis roulant qui fonctionnerait dans la direction des voies respiratoires supérieures. Les poussières, ainsi refoulées vers le carrefour œsophagien, sont dégluties et les bactéries détruites par l'acidité gastrique.

L'altération de ce dispositif, sous l'influence du tabac ou des fumées d'usines, est à l'origine de bronchites chroniques.

– Au niveau de la muqueuse vaginale

L'acidité du vagin ne permet pas l'implantation de bactéries autres que *Lactobacillus acidophilus*. Dans certains cas pathologiques (perturbations hormonales), le pH vaginal peut remonter vers des valeurs proches de 7; des infections vaginales peuvent alors se manifester sous la forme d'écoulements purulents.

– Au niveau de la muqueuse intestinale

L'écosystème que nous avons décrit s'oppose à l'implantation de germes pathogènes.

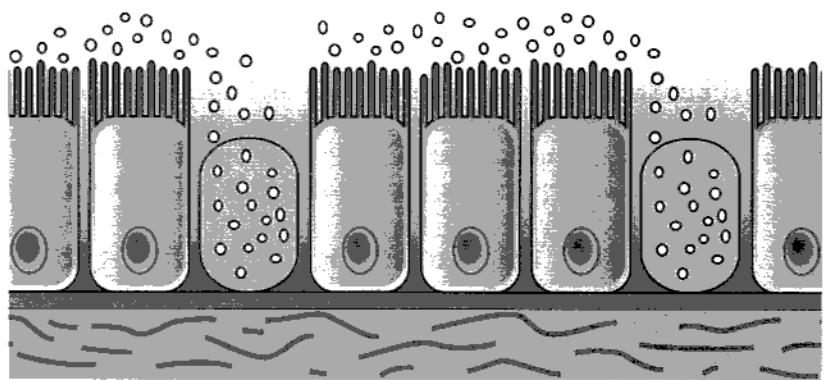


Fig. 31 – Structure schématisée de l'épithélium bronchique

5.2.2.2. Rôle des sécrétions

Certaines sécrétions recouvrent de nombreuses voies d'accès à l'intérieur de l'organisme, elles constituent de véritables « pièges à bactéries » : sécrétions cutanées, mucus bronchique, mucus recouvrant toutes les voies digestives.

D'autres, comme la salive, le lait, les larmes, contiennent une enzyme : le lysozyme aux propriétés bactéricides. Le lysozyme catalyse l'hydrolyse du peptidoglycane, il est donc particulièrement actif sur les bactéries à Gram+.

5.2.2.3. La barrière du tissu conjonctif

Le tissu conjonctif, situé sous le revêtement cutanéomuqueux, constitue la deuxième barrière anatomique pour les micro-organismes. Il est constitué d'une substance fondamentale faite, pour l'essentiel, d'un gel d'acide hyaluronique hydraté, de fibres musculaires, de collagène et des cellules conjonctives.

L'acide hyaluronique s'oppose à la pénétration des bactéries. D'autre part, le tissu conjonctif, richement vascularisé, pourra être le lieu d'un afflux de cellules phagocytaires en cas d'infection.

5.2.2.4. Les cellules et molécules de l'immunité non spécifique

Lorsque le revêtement cutanéomuqueux est franchi par des bactéries, apparaissent localement les signes de l'inflammation : rougeur, chaleur, douleur, œdème. Ce processus inflammatoire n'a rien de spécifique, d'autres phénomènes très différents peuvent le déclencher : contact avec les acides, les bases, chaleur, froid... Dans le cas d'une infection, la réaction inflammatoire a pour objet de mobiliser localement les cellules à activité phagocytaire destinées à détruire l'agent infectieux.

• Nature et propriétés des cellules à activité phagocytaire

Les polynucléaires neutrophiles sont actifs surtout sur certains germes : staphylocoques, streptocoques, pneumocoques, *Neisseria*. Ils sont très mobiles, peu résistants ; leur durée de vie est courte. Les monocytes se transforment en macrophages dans les espaces extravasculaires. Les macrophages sont actifs sur tous les agents infectieux, sauf ceux à multiplication intracellulaire. Ils sont moins mobiles que les polynucléaires et ont une durée de vie plus longue.

Ces cellules ont les propriétés particulières suivantes :

- la mobilité par émission de pseudopodes ;
- le chimiotactisme, phénomène par lequel les phagocytes sont attirés (chimiotactisme positif) ou repoussés (chimiotactisme négatif) par certaines substances ou particules : polyosides pariétaux des Gram+, endotoxines des Gram-, constituants tissulaires provenant de la dégradation du collagène dans le premier cas, certains constituants superficiels de la paroi des bactéries dans le second cas (protéine A de *Staphylococcus aureus*, protéine M des streptocoques par exemple) ;
- la capacité d'adhérer aux particules étrangères ;
- la capacité d'englober les particules.

• Diapédèse et phagocytose

L'intervention des polynucléaires nécessite, préalablement, leur sortie des vaisseaux : c'est la **diapédèse**. Attirés sur le lieu de l'infection par chimiotactisme positif, ils ont pour rôle d'éliminer les bactéries par le phénomène de phagocytose.

- Les étapes de la diapédèse

Les polynucléaires s'accumulent d'abord le long des parois vasculaires : c'est la margination. Ils adhèrent ensuite à la paroi, en dissocient le ciment interstitiel, et insinuent leurs pseudopodes entre les cellules qui favorisent leur passage en se rétractant. Les cellules peuvent alors gagner le tissu infecté et s'y déplacer.

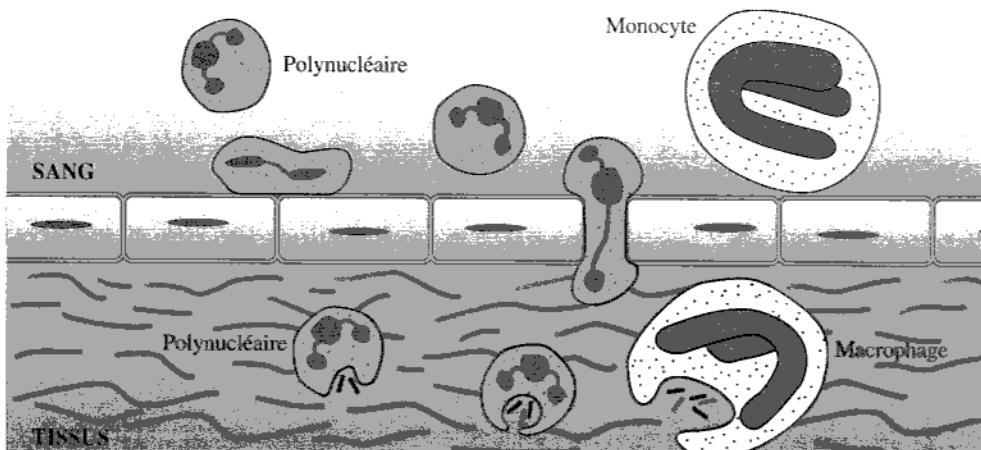


Fig. 32 – Schématisation de la diapédèse

– Les étapes de la phagocytose

Parvenus sur les lieux de l'infection, les phagocytes vont ingérer les bactéries et les détruire.

1. Phase d'adhésion

Les phagocytes émettent un voile (macrophages) ou des pseudopodes (polynucléaires) en direction des particules à englober. Ces formations assurent le contact avec les bactéries. Certains constituants favorisent l'adhésion : cations bivalents, complément, anticorps.

2. Englobement

Les pseudopodes fusionnent pour former une vacuole dans laquelle la particule est enfermée : le **phagosome**.

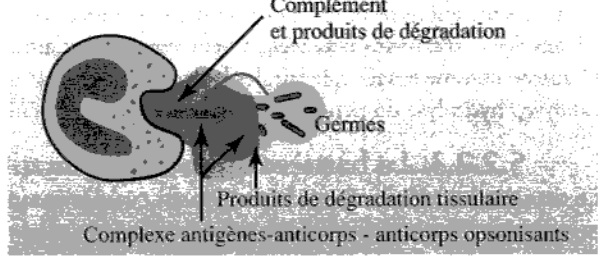
3. Digestion

Les lysosomes de la cellule phagocytaire se rassemblent autour de la vacuole, leurs membranes fusionnent avec celle de l'inclusion et leur contenu enzymatique est déversé dans la vacuole.

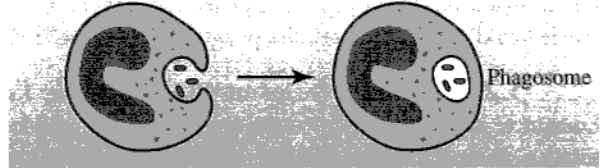
Les enzymes actuellement connues, impliquées dans la phagocytose sont la glucose 6 phosphate-déshydrogénase, une NADPH₂ oxydase, une myéloperoxydase, la glutathion-réductase, ainsi que diverses hydrolases (enzymes protéolytiques, glucidolytiques, nucléases...).

Certains agents infectieux peuvent persister ou se multiplier dans les phagocytes : méningocoques, gonocoques, *Salmonella*, *Brucella*, bacilles tuberculeux, toxoplasmes, certains virus...

1. Le chimiotactisme



2. L'englobement ou endocytose



3. Les deux étapes de la digestion

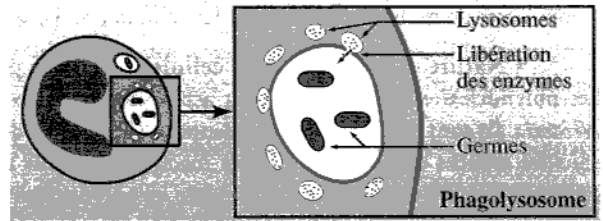


Fig. 33 – Schématisation de la phagocytose

• Complément et properdine

Le système complément est constitué d'un ensemble de 13 protéines sériques symbolisées C1 à C13, les 9 premières étant les plus importantes. Chacune de ces fractions existe sous forme inactive dans le sérum. Lorsque le système est mis en jeu, les différents composants sont activés en chaîne selon une séquence bien définie.

Deux modalités d'activation sont possibles, on en trouvera les étapes sur la figure 34.

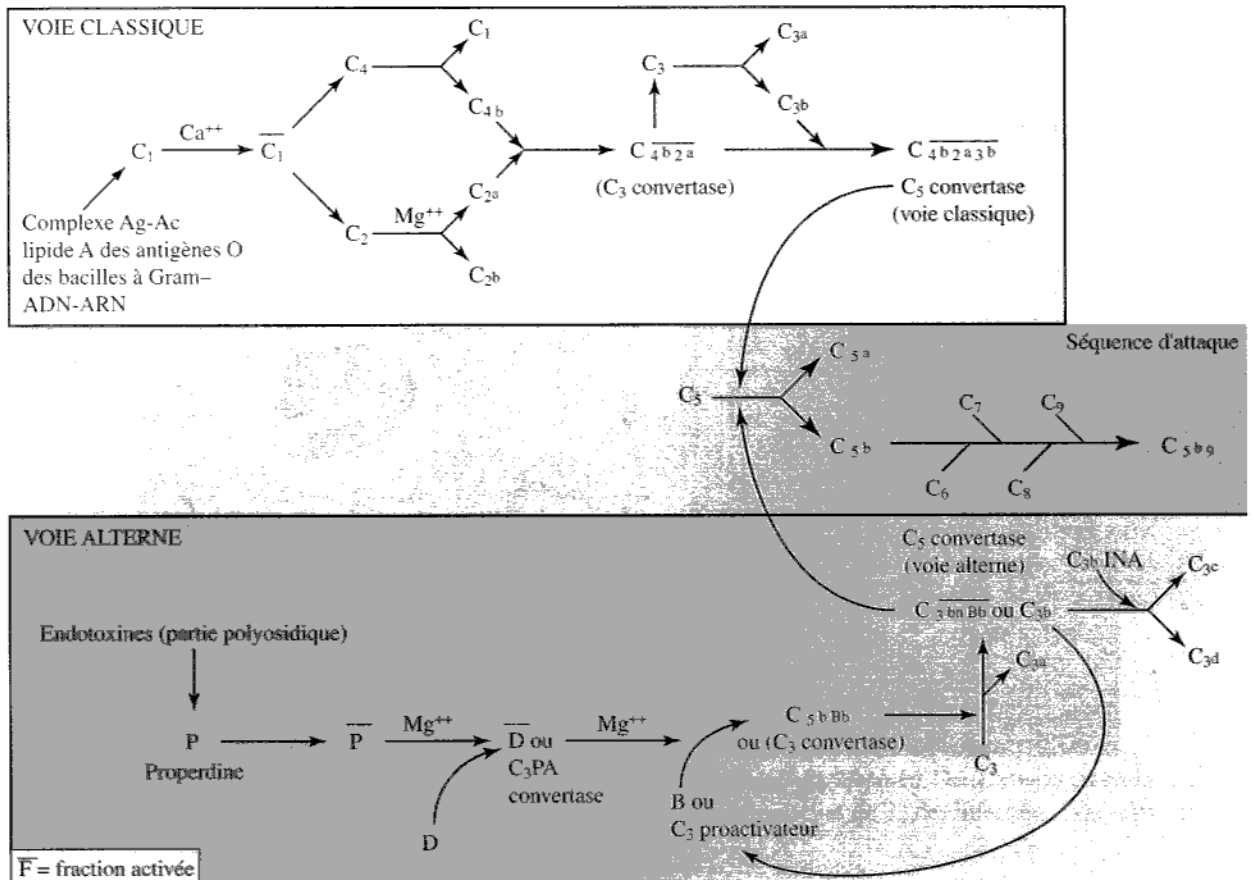


Fig. 34 – Les deux voies d'activation du complément

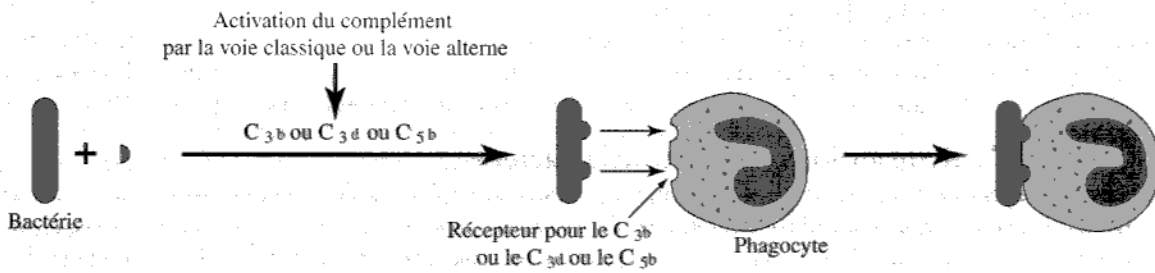


Fig. 35 – Rôle du complément dans l'adhésion des bactéries aux phagocytes

La voie classique est généralement activée par les immuns-complexes ; elle dépend donc, dans la plupart des cas, des anticorps. Cependant, elle peut aussi être mise en jeu par des processus ou des composants n'ayant aucun rapport avec les anticorps, comme le lipide A des endotoxines bactériennes, les ADN et ARN.

Il en est de même de la voie alterne qui est activée, par exemple, par le composant polysidique des endotoxines.

• Rôle du système complément-properdine

Dans les deux voies, classique ou alterne, l'activation en chaîne des diverses fractions a surtout pour but la production de C_3 convertase et C_5 convertase qui catalysent respectivement la scission du C_3 en deux fractions C_{3a} et C_{3b} et du C_5 en C_{5a} et C_{5b} .

Ces fractions du complément ont une importance considérable pour les défenses non spécifiques de l'organisme. En effet, le C_{3a} et le C_{5a} ont des propriétés chimiotactiques importantes et attirent les leucocytes sur le lieu de leur production.

D'autre part, le complément joue un rôle fondamental dans l'adhérence des agents pathogènes à la membrane des phagocytes : les macrophages ont des récepteurs pour le C_{3b} , C_{3d} et le C_{4b} , tandis que les polynucléaires n'en ont que pour le C_{3b} et le C_{3d} . Or, ces composés sont capables de se fixer sur la particule qui a provoqué leur activation. Toute particule susceptible d'activer le complément en l'absence d'anticorps (bacille à Gram-) pourra donc adhérer à la surface du phagocyte et être ingérée. Il en va de même de tout immun-complexe (bactéries-anticorps- C_{3b}). En présence ou en absence de réponse immune, l'activation du système complémentaire stimule donc l'action des cellules à activité phagocytaire.

5.2.2.5. Les défenses spécifiques de l'organisme

Elles sont représentées par les anticorps (effecteurs de la réponse à médiation humorale) et les lymphocytes T cytotoxiques (effecteurs de la réponse à médiation cellulaire).

• Les anticorps interviennent :

1. en favorisant la phagocytose. Les macrophages possèdent en effet des récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines. Celles-ci, qui sont fixées par leur fragment Fab à la bactérie (au virus ou au parasite), peuvent donc réaliser un pont entre le macrophage et le micro-organisme ;
2. en provoquant, en présence de complément, la lyse de la cellule bactérienne ;
3. en neutralisant la fixation des virus sur leurs récepteurs cellulaires ;
4. en recouvrant la capsule.

• Les lymphocytes T cytotoxiques sont dirigés spécifiquement contre les cellules porteuses de l'antigène.

Leur action peut libérer des bactéries, des virus ou des parasites intracellulaires sur lesquels s'exercera ensuite l'action des anticorps.

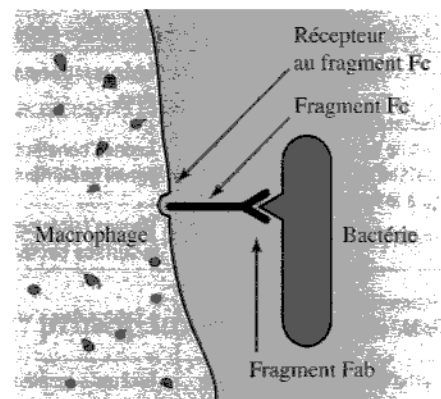


Fig. 36 – Rôle des anticorps dans l'adhésion des bactéries aux macrophages

5.2.3. Principales composantes du pouvoir invasif

5.2.3.1. Le franchissement du revêtement cutanéomuqueux

Toute lésion cutanée est une porte ouverte à l'infection. Peu de bactéries sont capables de franchir la peau saine. Les micro-organismes jouent rarement un rôle actif dans l'ouverture du revêtement cutané. Celle-ci est généralement d'origine traumatique.

5.2.3.2. Le franchissement des muqueuses

La situation est ici différente : des bactéries invasives peuvent intervenir efficacement dans la destruction localisée d'une muqueuse. En effet, la plupart d'entre elles possèdent, à leur surface, des structures d'adhésion leur permettant de se fixer sur les muqueuses.

L'adhérence d'une bactérie à une surface cellulaire constitue, en général, la première étape de la colonisation d'un site. Dans certains cas, cette colonisation permet l'implantation d'une flore commensale représentant une barrière de défense. Cependant, lorsque la bactérie est invasive, la colonisation peut aboutir à l'installation d'un foyer infectieux.

5.2.3.3. Le passage du tissu conjonctif

De nombreuses bactéries invasives possèdent un équipement enzymatique catalysant l'hydrolyse de constituants du tissu conjonctif: hyaluronidase, collagénase, protéases diverses. Le tissu conjonctif liquéfié est aisément franchi; les bactéries peuvent alors se multiplier dans l'organe concerné ou (et) gagner le sang et être disséminées vers d'autres organes.

5.2.3.4. L'activité antiphagocytaire de la bactérie

La plupart des germes virulents exercent une action antiphagocytaire soit par l'action de produits de sécrétion, soit du fait des propriétés de certains constituants de leur paroi (protéine A de *Staphylococcus aureus*, protéine M de *Streptococcus pyogenes*). Rappelons aussi que la capsule inhibe la phagocytose et que certaines bactéries ont la propriété de se multiplier dans les phagocytes et de les détruire.

En résumé, le pouvoir invasif d'une bactérie peut être lié à :

- son aptitude à adhérer à une muqueuse;
- son aptitude à produire des substances endommageant les barrières anatomiques de l'organisme;
- sa capacité à inhiber la phagocytose.

5.2.4. Les toxines

On appelle toxine toute substance toxique et antigénique élaborée par les bactéries. Cette définition exclut les substances allergisantes, non toxiques pour un organisme non sensibilisé, et certains produits toxiques mais non antigéniques du métabolisme. Elle intègre, cependant, des enzymes sécrétées par les bactéries qui sont à l'origine de lésions: streptolysines, hyaluronidases, collagénases...

5.2.4.1. Classification

La classification proposée par Raynaud et Allouf retient principalement deux critères :

- la localisation de la toxine en phase exponentielle de croissance: certaines ne sont libérées qu'après la lyse de la bactérie (endotoxines), d'autres (exotoxines) sont totalement ou partiellement libérées au cours de la vie du germe;
- la nature chimique: protéique ou glucidolipidoprotéique.

Ces deux critères permettent de distinguer 5 groupes dont les caractéristiques sont données dans le tableau ci-dessous.

Localisation au cours de la croissance exponentielle	Groupe	Nature chimique	Principales bactéries toxigènes
Restent localisées dans la cellule bactérienne ou à sa surface et ne sont libérées qu'à la lyse des bactéries	I	protéine	<i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Yersinia pestis</i> , <i>Clostridium perfringens</i>
	II	complexe glucido-lipido-polypeptidique	La plupart des bacilles à Gram-, par exemple <i>Salmonella</i> . « Endotoxines classiques ».
	III	protéine	Entérotoxine de <i>Staphylococcus aureus</i> .
Entièrement libérées dans le milieu en phase exponentielle	IV	protéine	Entérotoxine de <i>Vibrio cholerae</i> . Toxine de: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i> ,
Partiellement libérées dans le milieu en phase exponentielle	V	protéine	<i>Clostridium botulinum</i> , <i>Clostridium tetani</i> et de nombreux autres <i>Clostridium</i>

Tableau 6 – Classification des toxines

5.2.4.2. Propriétés des toxines

• Propriétés des toxines protéiques

140 toxines protéiques différentes sont actuellement inventoriées.

– Certaines possèdent un pouvoir toxique très élevé.

Les toxines botuliques et tétaniques sont les poisons les plus actifs que l'on connaisse: un milligramme de toxine suffirait à tuer 1 000 tonnes de matière vivante. Ainsi, il suffirait de 100 grammes de ces toxines pour supprimer toute vie humaine à la surface du globe. Elles sont (à masse égale) 15 000 fois plus actives que la substance chimique la plus toxique: l'aconitine.

Toxines	Dose minimale mortelle (DMM) par mg de protéine (pour la souris)
Botulique A	2 à $6 \cdot 10^{-11}$ g
Botulique B	2,5 à $3,5 \cdot 10^{-11}$ g
Botulique E	$8 \cdot 10^{-10}$ g
Diphthérique	$6,2 \cdot 10^{-8}$ g
Toxine α de <i>Clostridium perfringens</i>	$3,3 \cdot 10^{-4}$ g
Toxine staphylococcique α	10^{-6} g
Toxine tétanique	2 à $5 \cdot 10^{-11}$ g

Tableau 7 – Toxicité comparée de quelques toxines

– Leur **spécificité d'action est très étroite.**

Chaque toxine provoque des symptômes particuliers et ceux-ci peuvent être reproduits par son introduction dans l'organisme. Ceci est dû à l'affinité des toxines protéiques, chacune pour des structures cellulaires différentes appartenant, dans certains cas, à des cellules particulières. Ainsi, les toxines neurotropes se fixent sur des récepteurs du système nerveux, la toxine botulique se fixe au niveau de la plaque motrice, la toxine cholérique sur les gangliosides de la membrane des entérocytes, d'autres toxines ont une grande affinité pour les membranes cellulaires et sont lytiques (streptolysines).

D'autres, enfin, agissent sur le métabolisme cellulaire, comme la toxine diphtérique qui inhibe la biosynthèse des protéines en perturbant l'action du facteur d'élongation EF2 (ce facteur permet, au cours de la synthèse des protéines, l'addition d'un résidu d'acide aminé à la chaîne peptidique en cours de formation).

– Leur **pouvoir antigénique est très fort.**

Les anticorps produits en réaction au contact de l'organisme avec une toxine sont les antitoxines. Ils sont utilisés en sérothérapie. En fait, il est possible de distinguer les anticorps neutralisants des anticorps précipitants. Seuls les premiers sont protecteurs.

Par certains traitements (formol, chaleur), il est possible de faire perdre son pouvoir toxique à une toxine sans altérer son pouvoir antigénique : on obtient une anatoxine ; certaines constituent des vaccins.

• **Propriétés des toxines glucidolipidoprotéiques**

Contrairement aux toxines protéiques, ce sont des constituants de la cellule bactérienne. Elles correspondent au lipopolysaccharide de l'enveloppe externe (voir chapitre I – 4.2.2.1. La paroi).

Il est possible de les obtenir, par diverses méthodes, à un état de pureté satisfaisant. Injectée à faible dose à l'animal, l'endotoxine d'un bacille à Gram négatif provoque :

- une réaction fébrile dans la demi-heure qui suit l'inoculation, le maximum d'intensité se situant vers la troisième heure : c'est son pouvoir pyrogène ;
- une leucopénie intense, le nombre de leucocytes chutant à 40 % de sa valeur de départ.

Des doses élevées provoquent la mort de l'animal par collapsus cardiovasculaire, la pression artérielle baisse considérablement, le retour veineux est fortement diminué, les organes vitaux ne sont donc plus irrigués.

Le pouvoir antigénique des endotoxines est faible, on ne peut obtenir ni anatoxine ni antitoxine.

Elles stimulent le système immunitaire, et, de ce fait, accroissent la résistance à l'infection en agissant selon deux mécanismes distincts :

- en activant le système complément-properdine (voie alterne étudiée précédemment dans ce même chapitre) ;
- en stimulant la division des lymphocytes B (effet mitogène).

L'endotoxine de *Salmonella Typhi* est impliquée dans les mécanismes physiopathologiques de la fièvre typhoïde. Les cellules de *S. Typhi*, parvenues au niveau intestinal, sont captées par les ganglions mésentériques dans lesquels elles se multiplient et sont assez massivement lysées. L'endotoxine ainsi libérée agit :

- sur le système sympathique intestinal et entraîne indirectement la formation de lésions hémorragiques et de perforations qui font la gravité de la maladie ;
- sur les centres neurovégétatifs du troisième ventricule, engendrant les troubles nerveux de la fièvre typhoïde connus sous le nom de *tuphos*.

5.2.5. Les manifestations du conflit hôte/bactéries : principaux types d'infections et leurs localisations

5.2.5.1. Bactéries invasives

On distingue classiquement trois étapes dans la maladie infectieuse :

- la **phase d'incubation** se situe de la contamination à l'expression des premiers signes cliniques. Elle correspond au temps nécessaire à la multiplication des bactéries ou (et) à la sécrétion de leurs toxines en quantité suffisante ;
- la **période d'invasion** pendant laquelle les premiers signes cliniques apparaissent ; ils ne sont généralement pas spécifiques : fièvre, courbatures ou douleurs diffuses ;
- la **période d'état** où les signes cliniques sont souvent évocateurs et permettent le diagnostic.

• **Infections localisées**

Lorsqu'une bactérie pathogène franchit la peau ou une muqueuse, il se développe une infection locale. Le conflit hôte/bactérie se manifeste par la réaction inflammatoire (déjà décrite) ; il s'ensuit la constitution d'une zone tuméfiée, douloureuse et souvent purulente. Le pus est constitué de bactéries vivantes et mortes, de leucocytes, de débris de leucocytes, de produits de la nécrose des cellules environnantes et de substances produites par l'organisme (fibrine).

Au niveau cutané, il faut citer les différentes formes de staphylococcies (importantes à connaître pour leur incidence en hygiène alimentaire) : furoncles (suppuration profonde des follicules pileux), anthrax (réunion de plusieurs furoncles), impétigo (lésions bulleuses de la peau qui peuvent aussi être d'étiologie streptococcique).

Au niveau des muqueuses, signalons, pour exemples, les angines (à streptocoque A ou à pneumocoques), les otites, rhinopharyngites, gastro-entérites...

- **Infections loco-régionales**

Selon la nature de la souche dont le pouvoir invasif est plus ou moins important et l'état des défenses de l'organisme, l'infection localisée peut être guérie ou au contraire progresser. Les bactéries gagnent alors les ganglions, c'est le stade de l'infection loco-régionale qui se manifeste par des adénites et lymphangites.

- **Infections généralisées : les septicémies**

En présence d'une souche à fort pouvoir invasif, ou dans le cas de résistances à l'infection diminuées, les bactéries peuvent franchir l'obstacle du ganglion et atteindre le sang.

L'état septicémique est défini comme une infection généralisée due à des décharges répétées de bactéries pathogènes dans la circulation sanguine.

À partir du sang, les bactéries peuvent essaimer vers des organes profonds et engendrer des métastases infectieuses, on parle de septicopyohémie.

5.2.5.2. Bactéries toxigènes

Corynebacterium diphtheriae, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani* en sont les représentants les plus connus : ils sont responsables, respectivement, de la diphtérie, du botulisme et du tétanos. La sécrétion d'une toxine très active explique seule l'essentiel des symptomatologies. Les mécanismes physiopathologiques des toxi-infections alimentaires dues à des bactéries toxigènes et ceux du botulisme seront étudiés de façon détaillée dans la suite de l'ouvrage.

5.2.5.3. Bactéries invasives et toxiques

De nombreuses bactéries entrent dans cette catégorie. L'exemple le plus illustratif est, sans doute, celui des myonécroses. Les agents étiologiques en sont les *Clostridium* toxigènes, en particulier *Clostridium perfringens*.

Ces bactéries sont introduites, à la suite d'une blessure, dans une plaie profonde. Elles se multiplient activement dans la plaie et libèrent leurs enzymes : lécithinase, collagénase, diverses protéases... Celles-ci opèrent une véritable digestion du tissu musculaire. Les *Clostridium* sont fortement producteurs de gaz (à l'exception de *C. histolyticum*, responsable de gangrènes non gazeuses). Le gaz produit s'accumule dans les espaces rendus disponibles par la fonte des tissus et forme des poches qui, en éclatant, dispersent les germes. Ceux-ci reprennent plus loin leur activité. La plaie progresse rapidement, l'amputation est souvent nécessaire.

Parallèlement, les agents des myonécroses produisent leurs toxines. Dans le cas de *Clostridium perfringens*, la toxine a une activité hémolytique : les hématies sont massivement détruites avec pour conséquence une forte anémie, des troubles rénaux (les débits cellulaires colmatent les glomérules) et hépatiques (le foie ne parvient pas à éliminer toute l'hémoglobine), ceci se traduit cliniquement par l'ictère.

5.2.5.4. Bactéries opportunistes : les infections hospitalières (infections nosocomiales)

Les infections hospitalières résultent de la réunion de trois facteurs principaux.

- **L'immunodépression**

L'hôpital accueille de nombreux malades dont les défenses immunitaires sont plus ou moins affaiblies pour des raisons diverses : traitement immunodépresseur, diabète, cirrhose, grands brûlés, accidentés de la route, sujets ayant subi une greffe ou une grosse intervention chirurgicale. Tous ces malades sont très sensibles aux agents infectieux, y compris ceux dont la virulence est peu importante.

- **Le traitement**

Pour prévenir les infections, il est instauré un traitement antibiothérapeutique à large spectre dont l'effet indésirable est de sélectionner les germes résistants.

- **Les germes**

La sélection s'opère sur :

- des bactéries d'origine exogène présentes dans l'environnement du malade. On y trouve des *Pseudomonas* de différentes espèces. En effet, ces bactéries ont des exigences très limitées en source de carbone. Le facteur limitant de leur développement étant surtout l'eau, elles sont présentes dans tous les endroits humides : robinets, humidificateurs, linge, plantes ornementales, cathéters...
- les bactéries des flores commensales, en particulier celles de la flore intestinale. C'est à ce niveau surtout que se produisent les transferts de matériel génétique qui expliquent l'apparition des souches résistantes. Ces transferts sont essentiellement des transferts de plasmides de résistance, dits plasmides R. Ils circulent en particulier entre *Pseudomonas* et entérobactéries.

Les bactéries de l'hospitalisme sont des *Pseudomonas* (en particulier *P. aeruginosa*), des entérobactéries, celles du groupe KES (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*), celles du groupe *Proteus*, *Providencia*, *E. coli* mais aussi *Acinetobacter*, *S. aureus*, les entérocoques.

La contamination peut être réalisée par voie cutanée (contacts avec le personnel soignant), par l'intermédiaire des aliments, par la voie fécale, par le matériel médical (sondes, canules...).

La colonisation d'un territoire peut déboucher sur une infection localisée : infections de l'œil, de l'oreille externe ou moyenne, infections urinaires ascendantes dues à des manipulations exploratrices, infections pulmonaires, conséquences de canules trachéales, gastro-entérites, infections de plaies.

Toutes ces infections peuvent se compliquer par une septicémie.

5.2.6. Les différents modes de transmission des maladies infectieuses

Certaines maladies infectieuses se propagent très rapidement dans la population d'une région ou d'un pays, puis régressent. Elles se manifestent sous forme de poussées que l'on appelle **épidémies**. Quand un continent entier est atteint, il s'agit d'une **pandémie**.

Dans d'autres cas, au contraire, une faible partie de la population est atteinte et cette proportion varie peu avec le temps. La maladie est dite alors **endémique**.

Une maladie peut également ne se manifester que par des cas **sporadiques**.

Dans tous les cas, le problème de la transmission de l'agent pathogène doit être posé. Plusieurs modalités peuvent être envisagées.

5.2.6.1. La contamination directe

• Transmission par contact direct

Les maladies infectieuses transmises par contact direct sont peu nombreuses, ce sont essentiellement les maladies sexuellement transmissibles. Cependant, les contaminations survenant sur une plaie peuvent engendrer des infections graves :

- lorsque la plaie est profonde (infection par les *Clostridium* toxigènes) ;
- si le malade est immunodéprimé.

• Transmission par les voies respiratoires

Lorsque nous éternuons ou, plus simplement, lorsque nous parlons, nous émettons à une distance de plusieurs mètres de minuscules et nombreuses particules mucoprotéiques : les gouttelettes de Pflugge. Ces gouttelettes sont le support des micro-organismes variés constituant la flore commensale du rhino-pharynx. Des germes pathogènes sont éventuellement présents dans le cas des porteurs sains et des sujets souffrants ou convalescents d'une affection de la sphère ORL. En respirant ces particules, nous permettons le contact des micro-organismes qu'elles contiennent avec nos muqueuses.

De la même façon, des aliments, du linge, des objets peuvent être souillés et contaminer indirectement d'autres personnes.

Les infections des voies respiratoires supérieures, la tuberculose, la diphtérie, pour ne retenir que quelques exemples, sont transmises par cette voie.

• Transmission par morsure et par piqûre

Certaines maladies sont ainsi transmises à l'homme par l'intermédiaire d'un animal, l'hôte vecteur, qui assure la liaison entre un autre animal, réservoir de germes, et l'homme.

5.2.6.2. La contamination indirecte

• Aéroportée (voir précédemment)

• Transmission par les voies digestives

Les sujets atteints par une infection intestinale, les convalescents et les porteurs sains éliminent des micro-organismes entéropathogènes avec leurs selles.

La contamination d'un sujet sain est presque toujours indirecte et se fait par l'intermédiaire de l'eau et des aliments. L'estomac constitue une barrière efficace du fait de l'acidité de son contenu. C'est pourquoi la contamination des aliments ou de l'eau doit être assez importante pour engendrer une infection, la multiplication des germes dans l'aliment est presque toujours nécessaire. Le mécanisme et les caractères des principaux cas de diarrhées infectieuses transmises par les aliments sont étudiés avec les toxi-infections alimentaires d'origine bactérienne dans le *chapitre IV*.

Les contaminations d'origine fécale peuvent atteindre différents matériaux : eau et aliments, bien sûr, mais aussi linge, outils et matériel de cuisine... ; elle est généralement manuportée.

Le but de l'hygiène est, en agissant sur ces circuits, d'assurer la sécurité bactériologique des aliments.

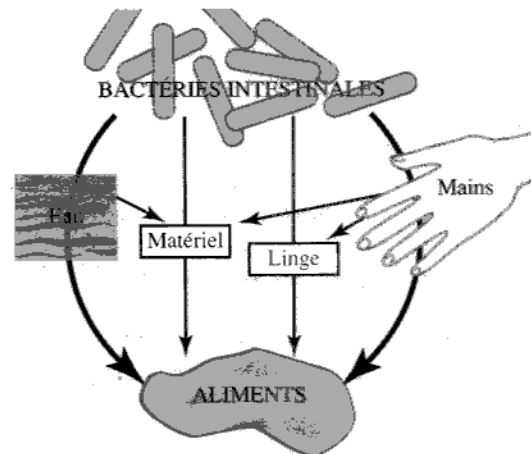


Fig. 37 – Contamination des aliments par les bactéries intestinales

CHAPITRE III

MICRO-ORGANISMES ET ALIMENTS

1. Les flores microbiennes des aliments : évolution et rôles

1.1. Origine des micro-organismes peuplant les aliments

Les aliments frais et périssables (légumes, fruits, viandes, poissons, produits laitiers...) sont rarement stériles. Les micro-organismes contaminants sont potentiellement très variés et peuvent être classés en deux catégories selon leur origine exogène ou endogène.

1.1.1. Contamination par des micro-organismes d'origine exogène

1.1.1.1. Les aliments peuvent être contaminés par des micro-organismes provenant des milieux naturels : sols, eaux, air

• La flore du sol

Le sol est abondamment pourvu en micro-organismes : algues microscopiques, bactéries, champignons. Un gramme de terre prélevée à la surface d'un champ peut contenir deux milliards de bactéries, trois milliards s'il provient d'un sol de forêt. La masse de bactéries représente jusqu'à 12 tonnes à l'hectare, soit plus que la masse des cultures parvenues à maturité ; celle des moisissures (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizoctonia*...) est d'environ 1 tonne à l'hectare. Parmi les groupes bactériens les plus représentés, figurent les Actinomycètes (100 000 à 30 000 000 par gramme de terre), *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Clostridium*, *Bacillus* et *Micrococcus*. Certains, moins bien représentés, jouent cependant un rôle important dans le cycle de l'azote : *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*.

• La flore de l'eau

En l'absence de toute pollution d'origine animale (par exemple une eau de source ou de torrent), les bactéries présentes dans l'eau proviennent du sol, des végétaux bordant le cours d'eau, et des plantes aquatiques.

La flore de l'eau est donc toujours abondante et très diversifiée : coques à Gram+ (microcoques) mais aussi bacilles à Gram- tels les *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* qui se développent bien en milieux humides, ainsi que les bactéries autotrophes intervenant dans le phénomène d'autoépuration.

La plupart des cours d'eau recueillent la pollution domestique d'origine humaine et animale. Ils se chargent de micro-organismes provenant de l'intestin de l'homme et des animaux : entérobactéries, entérocoques, *Clostridium*. Parmi ceux-ci peuvent se trouver des germes pathogènes, en particulier les *Salmonella* et les entérovirus. On sait, par ailleurs, que la plupart des bactéries d'origine fécale peuvent engendrer des infections sur des sujets dont les défenses immunitaires sont perturbées.

Les eaux de surface présentent donc des dangers pour la santé. La contamination d'aliments par une eau polluée peut être dommageable : risque d'intoxication, risque d'altération.

C'est pourquoi, les eaux destinées à la consommation ou utilisées dans les industries agro-alimentaires subissent des traitements destinés à éliminer les micro-organismes. Il s'agit classiquement d'une chloration (on utilise l'action oxydante des dérivés chlorés).

• La flore de l'air

L'air ne contient pas d'éléments nutritifs. Les bactéries qui y sont présentes ne peuvent donc s'y multiplier et s'y installer durablement. Elles sont en transit. La composition de la flore de l'air d'une salle dépend essentiellement de l'activité qui y est exercée.

Les micro-organismes de l'air sont, pour la plupart, fixés sur des poussières et véhiculés par elles.

Dans une salle vide, la flore de l'air est semblable à celle de l'air extérieur. La plupart des micro-organismes présents proviennent des poussières arrachées au sol et disséminées par le vent, les chaussures ou les vêtements.

En l'absence de tout mouvement d'air, les plus grosses particules sédimentent; ne persistent alors dans l'air que les poussières les plus fines. Les micro-organismes y sont donc en nombre plus faible. Les bactéries apportées par l'air extérieur sont des microcoques, des staphylocoques et des *Bacillus*. L'air est très riche en spores de moisissures. La flore de l'air renferme essentiellement des micro-organismes résistant à la dessiccation; ceci explique la prédominance des Gram+ et des moisissures, et la rareté des bacilles à Gram-.

Dans l'air d'une pièce où se trouvent plusieurs personnes, s'ajoutent des bactéries provenant du rhino-pharynx et projetées avec les particules de salive. Ces particules, desséchées, peuvent persister en suspension dans l'air sous forme de fines poussières.

Les micro-organismes d'origine exogène sont donc principalement:

- des bactéries à Gram positif: coques (microcoques, staphylocoques), bacilles (*Bacillus*, *Clostridium*, *Actinomyces*), et des moisissures, apportés par le sol et par l'air;
- des bacilles à Gram négatif provenant des eaux.

Ils sont en contact presque permanent avec la surface des légumes, des fruits, des pièces de viande..., peuvent contaminer les plats cuisinés, les pâtisseries et tout autre aliment exposé à l'air sans précaution particulière, au cours de leur recueil ou de leur préparation.

EXEMPLES

LE LAIT

Le lait est stérile dans la mamelle d'un animal sain. Après la traite, l'analyse microbiologique décèle presque toujours la présence de micro-organismes variés. Leur nombre dépend de l'application plus ou moins rigoureuse des mesures d'hygiène relatives à la traite et à la désinfection du matériel. On admet qu'un lait cru de bonne qualité contient moins de 100 000 micro-organismes par millilitre. La plupart de ces micro-organismes sont d'origine tellurique: ce sont des bactéries ou champignons saprophytes des eaux ou du sol. On les retrouve à la fois sur la mamelle et sur l'herbe (contact herbe/mamelle dans les pâturages) ou dans l'eau servant au lavage de l'appareil de traite.

LA VIANDE DE BOUCHERIE

Chez un animal sain, la chair musculaire (ainsi que tous les autres tissus utilisés pour la consommation humaine) est stérile. Cependant, à l'abattage, puis lors de la découpe, les contaminations par les micro-organismes peuplant le cuir des animaux, et ceux présents dans l'air ou sur l'outillage sont difficilement évitables. C'est ainsi que la flore bactérienne présente sur les carcasses se situe, en moyenne, entre 10^3 et 10^4 bactéries par cm^2 . Ont été isolés à la surface des carcasses, dans l'ordre de fréquence: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Brochothrix*, des entérobactéries (*Klebsiella*, *Yersinia*), *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Vibrio*, *Aeromonas*, mais aussi diverses levures et moisissures.

1.1.1.2. Les aliments peuvent être contaminés par les micro-organismes des flores commensales de l'homme et des animaux à l'occasion d'un contact direct avec la peau

• La flore de la peau

Les micro-organismes forment souvent des micro-colonies sur les couches kératinisées de l'épiderme. Au niveau des poils, on trouve surtout des bactéries anaérobies qui prolifèrent au sein du follicule pilo-sébacé. Deux espèces sont constantes quel que soit le territoire cutané: *Staphylococcus epidermidis* et *Propionibacterium acnes*. D'autres micro-organismes sont fréquents et sont considérés comme faisant partie de la flore normale: corynébactéries, microcoques, levures et moisissures. Certaines espèces ne sont présentes qu'occasionnellement ou sur des sites particuliers:

- *Staphylococcus aureus* dans les fosses nasales et sur le périnée;
- bacilles à Gram- sur toutes les régions humides (plis, aisselles...):
 - entérobactéries d'origine fécale,
 - *Acinetobacter*, *Pseudomonas* provenant de l'environnement.

Les zones proches de réservoirs microbiens (régions périanale et péri-buccale), humides, ou riches en sécrétions sébacées présentent des conditions favorables à la pullulation microbienne. D'autres, desséchées et arides, exposées à l'air, ont une flore moins abondante (leur rôle n'en est pas moins important au plan de la contamination de denrées alimentaires).

• Flores cutanées résidentes et transitoires

Au niveau de la peau, il est classique de distinguer la flore résidente de la flore transitoire.

La flore résidente d'une surface cutanée est constituée par l'ensemble des espèces microbiennes que l'on y retrouve en quantité notable dans tous les prélèvements.

Elle varie selon les zones considérées. On peut, par exemple, considérer comme résidentes les espèces suivantes :

- sur la main : *Staphylococcus epidermidis*, d'autres staphylocoques coagulase-, *Propionibacterium acnes*, diverses espèces de corynébactéries ;
- au niveau du périnée : *Staphylococcus aureus* ;
- au niveau des aisselles : entérobactéries et *Acinetobacter*.

Contrairement à la flore transitoire, la flore résidente ne peut être éliminée en totalité par un nettoyage, même par les antiseptiques les plus puissants.

Cette observation situe bien l'intérêt et les limites du lavage des mains. En effet, les bactéries constituant la flore transitoire sont souvent soit pathogènes, soit occasionnellement pathogènes, soit opportunistes : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas*, entérobactéries, *Acinetobacter* en sont les représentants les plus fréquents. Elles constituent un danger pour le consommateur dans le contexte des industries agro-alimentaires : en effet, certaines espèces responsables d'intoxications alimentaires (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium perfringens*) peuvent habiter passagèrement la peau, surtout sur les mains, et être transmises à un aliment.

Le contact de denrées alimentaires avec la peau peut donc, lorsque les précautions d'hygiène sont négligées, être à l'origine de contaminations par des micro-organismes d'origine fécale dont certains sont entéropathogènes et susceptibles d'engendrer, si les conditions sont propices à leur multiplication, des toxi-infections alimentaires.

Citons : *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, dont l'épidémiologie et la pathologie seront abordées dans un chapitre ultérieur.

1.1.1.3. Le travail des aliments dans l'usine ou en cuisine est la source de nouvelles contaminations potentielles

En effet, les cellules microbiennes s'attachent assez bien aux parois en bois, en verre ou aux surfaces métalliques. Le phénomène est moins marqué avec des objets en matière plastique. Le contact d'un produit alimentaire avec des surfaces mal nettoyées (plan de travail, machines, petit outillage) augmente généralement sa charge microbienne.

1.1.2. Origine endogène

Les micro-organismes contaminants proviennent, dans ce cas, de l'organisme à partir duquel est produit l'aliment.

Deux cas sont envisageables.

• 1^{er} cas : ils appartiennent aux flores commensales de cet organisme.

Les lactobacilles et les streptocoques du lait cru proviennent du pis et des canaux galactophores dont ils sont les commensaux.

La plupart des contaminants d'origine endogène sont cependant d'origine intestinale. Ce sont (voir chapitre II – 5) des bactéries anaérobies (*Clostridium*, *Bacteroides*), aéro-anaérobies (entérobactéries), micro-aérophiles (entérocoques, *Campylobacter*) ; elles peuvent contaminer la chair musculaire à l'occasion de l'éviscération de l'animal ou (et) de sa découpe. Par ailleurs, le passage de bactéries intestinales dans le sang en période post-prandiale est relativement fréquente pour des animaux comme le bœuf et le porc.

Ces bactéries peuvent donc, dans ces circonstances, être présentes dans la chair (du fait de sa forte irrigation). Ceci explique que l'abattage doit être effectué à jeun.

• 2^e cas : l'aliment est préparé à partir d'un organisme malade.

Une contamination de ce type est moins fréquente du fait des contrôles vétérinaires imposés par la réglementation.

Dans le cas de produits végétaux, elle ne constitue pas un danger pour le consommateur car les micro-organismes phytopathogènes sont presque toujours inoffensifs pour l'homme et les animaux. Elles sont, cependant, à l'origine d'altérations de l'aliment, préjudiciables à sa commercialisation.

La situation est très différente dans le cas des denrées d'origine animale. En effet, certaines bactéries pathogènes pour l'animal le sont aussi pour l'homme. Citons : *Brucella* (fièvre de Malte ou fièvre suduroalgique), les bacilles tuberculeux, *Francisella tularensis* (agent de la tularémie), *Salmonella*, *Pasteurella*... C'est également le cas du prion de l'encéphalopathie spongiforme bovine chez les bovins atteints par la maladie « de la vache folle », responsable chez l'homme de la maladie de Creutzfeldt-Jakob nouveau variant.

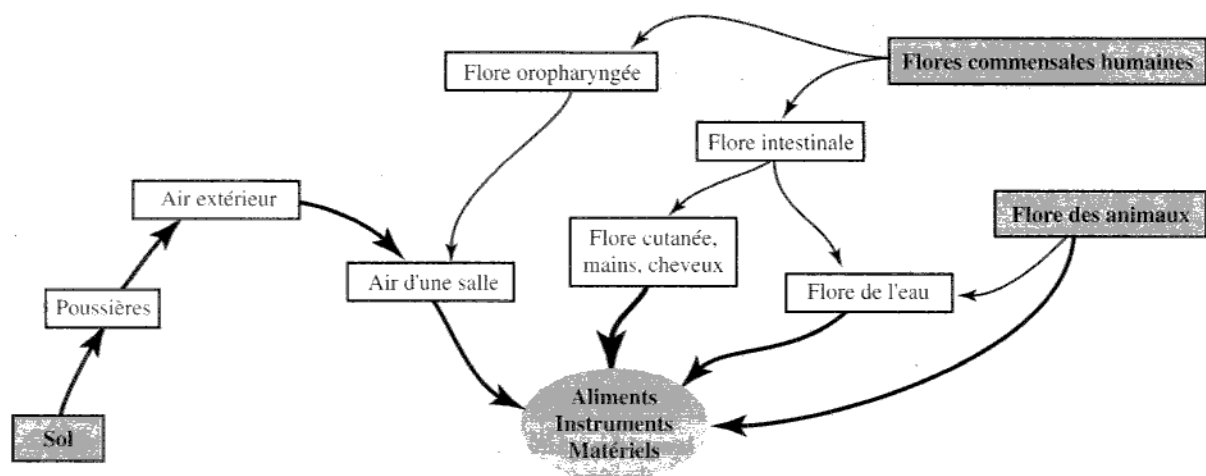


Fig. 1 – Schéma récapitulatif de l'origine des contaminants

1.2. Devenir et rôles des micro-organismes contaminant les aliments

Chaque aliment constitue un milieu dont les caractères physicochimiques : pH, activité de l'eau, composition chimique, conditions de stockage sont différents.

Seuls quelques groupes microbiens adaptés à ces conditions pourront s'y maintenir et s'y développer. Ceci explique que la flore définitive d'un aliment soit sensiblement différente de la flore originelle.

1.2.1. Principaux facteurs de sélection

1.2.1.1. Le pH

De nombreux champignons microscopiques se développent encore à des pH voisins de 2 ou supérieurs à 9. La plupart des bactéries ne prolifèrent pas dans ces conditions et exigent un milieu proche de la neutralité.

C'est pourquoi, les moisissures et les levures sont les micro-organismes les mieux représentés à la surface de fruits acides. Au contraire, les viandes et les poissons, dont le pH est proche de 7, constituent un substrat favorable pour le développement des bactéries. Celles-ci l'emportent sur les champignons car leur taux de croissance est beaucoup plus élevé.

Les bactéries acidophiles sont cependant bien adaptées aux substrats acides; les *Lactobacillus* et certains streptocoques lactiques jouent un rôle essentiel dans l'évolution naturelle ou provoquée des produits laitiers.

1.2.1.2. Le potentiel d'oxydoréduction

Rappelons qu'en fonction de leurs relations avec l'oxygène, les micro-organismes sont classés en quatre catégories :

- les micro-organismes anaérobies stricts ne se développent qu'en l'absence d'oxygène;
- les micro-organismes aérobies stricts, au contraire, ne peuvent croître qu'en présence d'oxygène;
- les micro-organismes aéroanaérobies se développent quel que soit le potentiel d'oxydoréduction du milieu;
- les micro-organismes micro-aérophiles, bien qu'exigeant de l'oxygène, affectionnent les milieux peu oxygénés.

Le potentiel d'oxydoréduction d'un aliment dépend :

- de sa composition et de sa texture (il autorise plus ou moins la pénétration de l'oxygène);
- de son conditionnement :
 - avec ou sans emballage,
 - l'emballage est plus ou moins perméable à l'air,
 - l'aliment se trouve ou non sous une atmosphère artificielle (vide plus ou moins poussé, atmosphère d'azote et de dioxyde de carbone).

1.2.1.3. L'activité de l'eau

L'eau présente dans un aliment est plus ou moins disponible. On distingue classiquement l'eau libre et l'eau liée, cette dernière étant retenue par les molécules de l'aliment.

On désigne sous le nom d'activité de l'eau ou A_w , un paramètre de l'aliment mesurant la disponibilité globale de l'eau pour participer, par exemple, à des réactions chimiques ou se transformer en vapeur.

L'activité de l'eau est définie par le rapport entre la pression partielle de vapeur engendrée par un aliment dans une atmosphère close et la pression partielle de l'eau pure placée dans les mêmes conditions.

Chaque aliment est caractérisé par son A_w . On peut, d'autre part, déterminer pour chaque groupe bactérien, une valeur de l' A_w au-dessous de laquelle la croissance sera inhibée.

La connaissance de ces caractéristiques permet de comprendre, si l'on ne considère en première intention que ce facteur de sélection, la composition des flores d'altération d'aliments d' A_w différentes.

A_w	Micro-organismes inhibés aux A_w situées	Exemples de produits alimentaires dont l'A_w se situe en dessous de la limite inférieure indiquée dans l'intervalle indiqué
1,00 - 0,95	Bacilles Gram-.	Produits frais : viandes, poissons, fruits, légumes, produits laitiers, pain...
0,95 - 0,91	Nombreuses bactéries à Gram+, sporulées ou non.	Jambon cru, fromages, aliments renfermant 55 % de saccharose.
0,91 - 0,87	Nombreuses levures.	Saucisson sec, fromages à faible teneur en eau.
0,87 - 0,80	Nombreuses moisissures, <i>Staphylococcus aureus</i> .	Légumes secs, farines, lait concentré sucré, gâteaux secs.
0,80 - 0,75	Bactéries halophiles.	Aliments renfermant 26 % de sel ou 15 à 17 % d'eau.
0,75 - 0,65	Moisissures xérophiles.	Aliments renfermant 10 % d'eau (flocons d'avoine).
0,65 - 0,60	Levures osmophiles.	Fruits secs, bonbons.
0,60 - 0,50		Pâtes alimentaires.
0,50 - 0,40		Œufs en poudre.
0,40 - 0,30		Biscuits.
0,30 - 0,20		Lait en poudre, légumes déshydratés.

Tableau 1 – A_w de quelques aliments et A_w inhibitrices pour différents groupes de micro-organismes (d'après Mosel)

À l'examen de ces résultats, il apparaît clairement que les moisissures et les levures sont les micro-organismes les moins exigeants par rapport au critère A_w .

Elles constituent donc les espèces dominantes, sinon exclusives, de la flore des aliments secs comme la farine, le riz, les légumes secs, qui, à l'état brut, présentent une humidité de 15 à 17 % (ce qui correspond à des A_w comprises entre 0,80 et 0,87). Lorsque, au contraire, l'humidité relative d'un aliment, donc son A_w , est élevée, la plupart des micro-organismes peuvent s'y installer. Ce sont donc les bactéries qui s'y développent car elles prolifèrent plus vite que les champignons microscopiques.

1.2.1.4. Les nutriments

La plupart des micro-organismes se développant sur un aliment y trouvent l'ensemble des nutriments nécessaires pour leur croissance.

Les glucides simples, les acides aminés, entrent dans la composition d'un grand nombre d'aliments et sont largement utilisés par une grande variété de micro-organismes comme source de carbone et d'énergie.

Certains micro-organismes sont cependant spécialisés : pectinolytiques (hydrolysant la pectine), cellulolytiques, lignolytiques... Ils se développent préférentiellement soit sur ces substrats, soit sur et dans les aliments riches en pectine, en cellulose, en lignine... Prenons l'exemple des légumes frais, aliments répondant à ces critères mais pauvres en glucides directement assimilables. Leur flore d'altération est constituée, dans un premier temps, presque exclusivement de micro-organismes pectinolytiques et cellulolytiques. L'hydrolyse de ces macromolécules végétales aboutit à la production de glucides simples aux dépens desquels se développe, dans un deuxième temps, une flore différente et beaucoup plus diversifiée.

Sur un même aliment, peuvent donc se succéder plusieurs flores, chacune étant sélectionnée par les conditions de milieu créées par l'activité de la précédente. Ce phénomène est appelé métabiose. Nous en étudierons un autre exemple en abordant, ultérieurement, l'évolution des flores microbiennes au cours de l'affinage d'un fromage.

1.2.1.5. La température

Rappelons que la croissance des micro-organismes n'est possible qu'entre certaines limites et que l'on peut, en fonction de ce critère, les classer en quatre groupes (voir chapitre II – tableau 4) : psychrophiles, psychrotrophes, mésophiles, thermophiles.

Les conditions de stockage influencent donc la composition de la flore microbienne d'un aliment. L'exposition au froid sélectionne les espèces psychrotrophes et psychrophiles comme certaines espèces de *Pseudomonas*, *Flavobacterium* et *Achromobacter*, mais aussi *Listeria* et *Yersinia* dont nous verrons que l'implication dans des toxi-infections alimentaires peut être, au moins partiellement, attribuée à l'usage prolongé de la réfrigération.

Inversement, le maintien d'un aliment à une température élevée a pour effet de détruire les espèces psychrophiles et psychrotrophes et de sélectionner les micro-organismes thermophiles (si la température n'excède pas certaines valeurs).

Du fait de la thermorésistance de leurs spores, les micro-organismes sporulés représentent un cas particulier. Un chauffage de 30 minutes à 115 °C est en général nécessaire pour les détruire. Tout chauffage d'un aliment à des températures comprises entre 80 et 115 °C sélectionne donc les espèces sporulées dont la plupart appartiennent aux genres *Bacillus* (bactéries aérobies) et *Clostridium* (bactéries anaérobies).

1.2.2. Conséquences au niveau de l'aliment de l'activité d'une flore microbienne

De l'étude précédente, il ressort :

- qu'une grande variété de micro-organismes peut contaminer un aliment ;
- que, parmi ceux-ci, seules quelques espèces s'adaptent aux conditions de milieu qui sont celles de l'aliment. Leur multiplication peut entraîner des effets indésirables : les altérations, ou, au contraire, être recherchée dans le cadre de la production d'un aliment.

1.2.2.1. Conséquences négatives pour l'aliment : les altérations

Leurs manifestations sont de trois sortes.

• Modification de l'aspect

L'aspect extérieur d'un aliment est souvent affecté par la prolifération d'une flore microbienne. Lorsque les qualités organoleptiques ne sont pas modifiées, le problème est d'ordre exclusivement économique : l'aliment se vend moins bien (exemple : la tavelure des fruits).

• Modification de l'aspect et des caractères organoleptiques

Le développement de micro-organismes sur un aliment s'accompagne généralement de la transformation de certains substrats et de la production de molécules nouvelles qui modifient l'aspect, le goût et l'odeur de la denrée. De telles transformations ne sont perceptibles qu'à partir d'un certain seuil, celui des cellules de la sphère ORL sensibles à ces stimuli. Ceci explique que l'altération d'un aliment ne soit décelable (et donc nuisible sur un plan économique) que lorsque la prolifération des groupes microbiens qui en sont responsables atteint un niveau critique, variable selon la nature du (des) micro-organisme(s) en cause.

• Augmentation du risque toxique

Dans la plupart des cas d'altérations, les micro-organismes présents sur l'aliment ainsi que les produits de leur activité métabolique, ne constituent pas un réel danger pour la santé du consommateur.

Cependant, le développement dans un aliment de certaines espèces microbiennes peut être à l'origine d'intoxications :

- *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter* sont entéropathogènes pour l'homme ;
- *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* produisent une toxine très active ;
- *Listeria monocytogenes* ;
- diverses espèces produisant des décarboxylases, en se développant sur le poisson, sont à l'origine d'intoxications en relation avec la production et l'ingestion d'histamine.

La prolifération de moisissures sur les aliments augmente le risque toxique du fait de la production, par certaines espèces, de mycotoxines.

1.2.2.2. Utilisation de l'activité microbienne pour la fabrication d'aliments

L'activité d'un ou de plusieurs groupes microbiens bien ciblés peut être utilisée pour transformer un aliment brut en un aliment nouveau.

C'est le cas des dérivés du lait (yaourts, fromages), de boissons alcoolisées (vins, bières), d'aliments fermentés (choucroute).

Dans ce cas, les conditions devront être réunies pour que soient sélectionnés les groupes microbiens compétents pour assurer ces transformations et que soient inhibés ceux dont l'activité serait nuisible au processus recherché.

La nature est souvent en mesure de faire efficacement le tri : il n'est pas absolument indispensable d'agir sur les flores microbiennes lors de la fabrication des yaourts, du vin ou de nombreux fromages. La tendance est, cependant, « d'aider la nature », voire de reproduire les processus naturels par l'utilisation de ferments sélectionnés.

2. Transformations des aliments par les micro-organismes

2.1. Relations avec le métabolisme microbien (approche simplifiée)

La plupart des micro-organismes susceptibles de se développer sur un aliment sont chimiotrophes. Ils exercent donc sur différents constituants des aliments une action catabolique (de dégradation) destinée à produire à la fois l'énergie et les molécules de base nécessaires à la synthèse de leurs propres constituants.

2.1.1. Les constituants des aliments source d'énergie pour les micro-organismes

2.1.1.1. Les bactéries aérobies strictes (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*...)

Elles produisent leur énergie en oxydant complètement leurs substrats carbonés en dioxyde de carbone et eau. Ce processus est peu acidifiant. Les rendements énergétiques sont considérables : 38 ATP par molécule de glucose.

2.1.1.2. Les bactéries anaérobies et aéroanaérobies facultatives

Elles oxydent incomplètement les glucides en divers produits de fermentation. Le rendement énergétique est faible : 2 ATP par molécule de glucose.

Ces processus sont parfois très complexes. La figure 2 en schématise les principales voies.

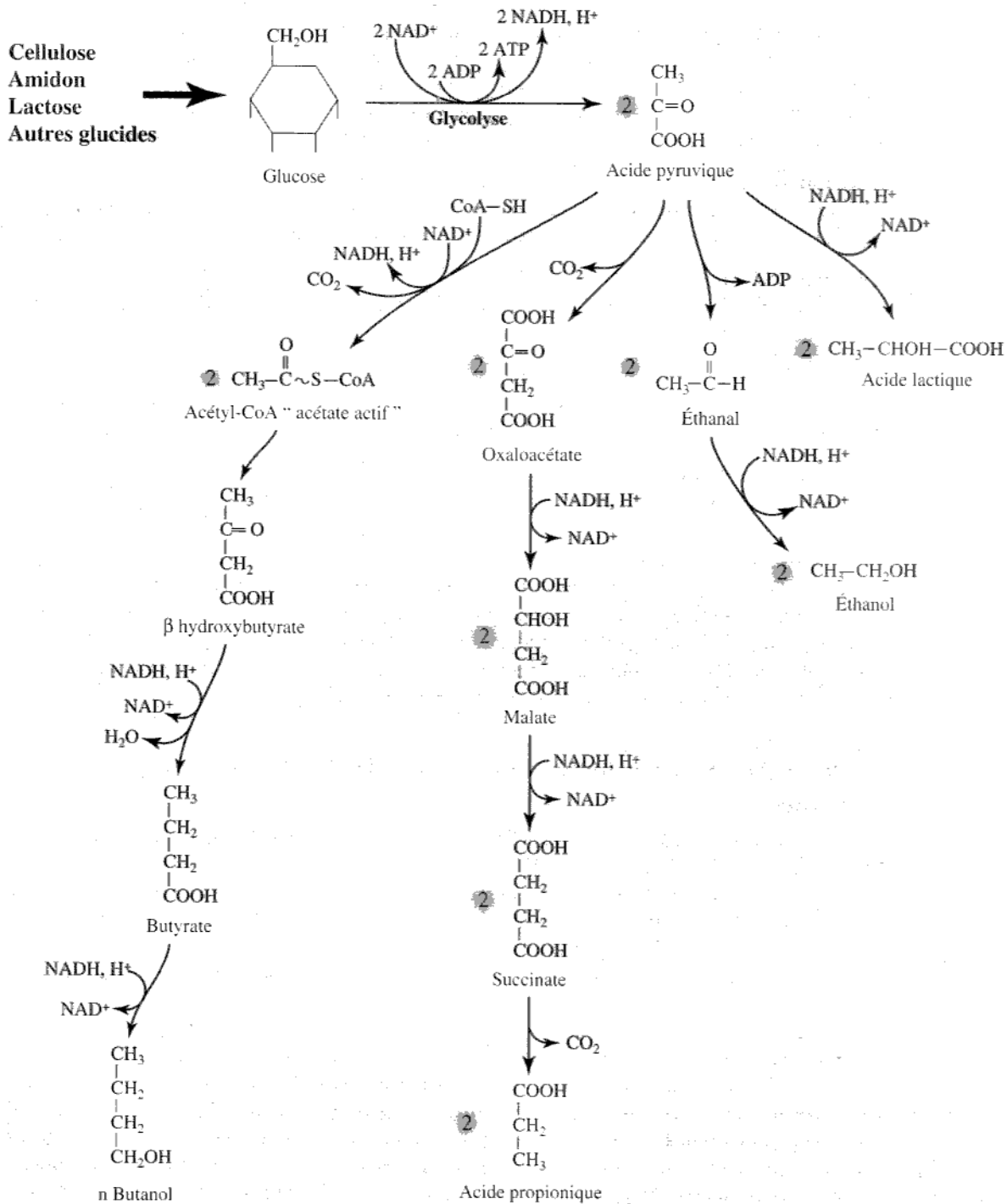


Fig. 2 – Mécanismes biochimiques des principales fermentations microbiennes

2.1.1.3. Quelques explications...

La plupart des fermentations ont, avec le métabolisme respiratoire, une étape commune : la glycolyse, au cours de laquelle le glucose est oxydé en acide pyruvique. L'oxydation revient ici à une déshydrogénation catalysée par un coenzyme spécifique : le NAD⁺ qui prend en charge l'hydrogène pour former du NADH, H⁺. Ce dernier doit être réoxydé pour intervenir à nouveau dans la glycolyse. Les étapes qui suivent la glycolyse et qui caractérisent les différentes fermentations ont donc pour intérêt principal le recyclage du NAD⁺. Les réactions couplées avec la transformation NADH, H⁺ → NAD⁺ seront à repérer dans ces schémas.

Pour y parvenir les micro-organismes, selon leur nature, peuvent emprunter des voies très diverses.

• La fermentation lactique

C'est la voie la plus simple. L'accepteur d'hydrogène est l'acide pyruvique; sa réduction conduit à l'acide lactique. Cette fermentation est très importante en microbiologie alimentaire. *Streptococcus lactis* et *Lactobacillus bulgaricus* pratiquent la fermentation homolactique: à partir du glucose, ils produisent un mélange de substances au sein desquelles l'acide lactique est largement prédominant. Cette fermentation est très acidifiante. D'autres espèces de *Lactobacillus* ainsi que les *Leuconostoc* donnent, dans les mêmes conditions, un mélange contenant, à côté de l'acide lactique, des quantités relativement importantes d'acide éthanoïque (acétique), d'éthanol, de glycérol et du dioxyde de carbone. Elles sont moins acidifiantes.

• La fermentation alcoolique

Par fermentation alcoolique, les levures transforment le glucose en éthanol, mais aussi partiellement en glycérol. Le glycérol provient, dans ce cas, de l'hydrogénation d'une substance intermédiaire de la glycolyse.

• La fermentation acide mixte

Elle est pratiquée par de nombreuses entérobactéries et conduit à la production d'acides lactique, acétique, formique, succinique, d'éthanol, de dioxyde de carbone et d'hydrogène.

• La fermentation butyrique

La plupart des espèces de *Clostridium* ont une activité fermentative intense. Certaines pratiquent la fermentation butyrique avec production d'acide butyrique, de butanol, d'acétone, d'isopropanol, de dioxyde de carbone et d'hydrogène.

• La fermentation propionique

C'est la voie métabolique principale de *Clostridium propionicum* et des corynébactéries. Elle conduit aux acides propionique, acétique, succinique.

Il serait vain de vouloir faire un inventaire complet.

On voit que les fermentations microbiennes transforment assez radicalement les substrats sur lesquels elles s'exercent. Certes, le but principal de ces processus est la production d'énergie utilisable par les micro-organismes, cependant, le résultat perceptible au niveau de l'aliment est un remaniement plus ou moins important de sa composition et de l'ensemble de ses caractéristiques.

2.1.2. Les constituants de l'aliment, source de carbone pour les micro-organismes

À partir d'un pool d'acides aminés, une bactérie est capable de produire ses protéines en les enchaînant suivant un ordre qui varie selon la protéine, et est codé au niveau de son ADN.

Les lipides bactériens sont synthétisés à partir de leurs constituants de base: acides gras, glycérol, choline, acide phosphorique...

Il en est de même pour les acides nucléiques formés de l'assemblage de diverses bases organiques (adénine, thymine, cytosine, guanine), de ribose ou de désoxyribose et d'acide phosphorique.

Tous ces composés se trouvent dans un pool dans lequel la machinerie cellulaire puise pour former les macromolécules qui la constituent.

Ce pool peut être alimenté de deux façons:

- soit par transformation de diverses substances formées au cours des réactions du métabolisme énergétique. Nous avons vu au chapitre II que les bactéries sont capables de produire tous ces matériaux de base à partir d'une seule source de carbone et parfois de facteurs de croissance. Ces biosynthèses peuvent être longues et complexes et consomment de l'énergie;
- soit par hydrolyse des constituants de l'aliment. Ainsi, l'hydrolyse des protéines alimentaires par les micro-organismes fournit les acides aminés nécessaires à la synthèse de leurs propres protéines. Celle des lipides ou des acides nucléiques contenus dans l'aliment donne les constituants qui, réassemblés par les bactéries, permettent la synthèse de lipides ou d'acides nucléiques bactériens.

Il va de soi qu'un micro-organisme, lorsqu'il disposera des deux possibilités pour alimenter ses biosynthèses, choisira la plus simple, la plus économe en énergie: la deuxième.

Plusieurs groupes microbiens ont une activité protéolytique importante: de nombreux *Pseudomonas*, *Flavobacterium* et *Acinetobacter* parmi les bactéries aérobies strictes, *Serratia*, *Proteus*, certains entérocoques pour les bactéries aéroanaérobies facultatives, de nombreux *Clostridium* (anaérobies), la plupart des *Penicillium* ou *Geotrichum*.

Des bactéries comme les *Serratia*, certains *Pseudomonas*, les staphylocoques, diverses moisissures sécrètent soit une lipase (catalysant l'hydrolyse des triglycérides), soit une lécithinase.

D'autres micro-organismes (parfois les mêmes) produisent des nucléases hydrolysant les acides nucléiques avec production de leurs constituants de base.

En conclusion, placé sur un aliment, un micro-organisme ne fonctionnera pas comme dans un milieu synthétique minimum. Il utilisera, grâce à son équipement enzymatique, les possibilités souvent importantes apportées par ce milieu tout à fait particulier.

Dans ce cas encore, les conséquences pour l'aliment seront à la mesure de l'ampleur du développement microbien avec des modifications sensibles au niveau de sa composition.

2.1.3. Des réactions cataboliques préalables

La plupart des voies métaboliques destinées à la production d'énergie ont pour point de départ un sucre simple. Certaines substances contenues dans l'aliment feront l'objet d'une véritable digestion microbienne pour les rendre utilisables. Ainsi, l'amidon, la cellulose sont transformés en glucose par diverses amylases et cellulases microbiennes ; la pectine, la lignine, la chitine sont dégradées par des enzymes spécifiques en substances utilisables pour la production d'énergie. Ces réactions contribuent aussi aux modifications occasionnées à l'aliment par la prolifération microbienne.

2.2. Principales altérations alimentaires d'origine microbienne

2.2.1. Altérations des viandes et des volailles

La viande fraîche, du fait de sa richesse en nutriments, de son pH (proche de 7), de son humidité élevée, constitue un excellent milieu de culture pour la plupart des micro-organismes : aérobies en surface, anaérobies ou aéroanaérobies facultatifs en profondeur.

Cependant, dès l'abattage, ces paramètres évoluent. L'arrêt de l'irrigation, l'apparition de la rigidité cadavérique sont à l'origine d'un abaissement progressif du potentiel d'oxydoréduction : le milieu devient de plus en plus réducteur.

Par ailleurs, la viande crue soumise à l'action de ses enzymes et à celles des micro-organismes subit une protéolyse partielle, l'hydrolyse du glycogène en glucose et la fermentation lactique du glucose produit. Ainsi peut-on expliquer d'une part, un certain attendrissement de la viande, d'autre part, un abaissement de son pH dont l'ampleur dépend de l'état physiologique de l'animal (cet abaissement sera modéré pour un animal fatigué dont les réserves glycogéniques sont faibles).

Ces évolutions, favorables pour le consommateur et recherchées par le boucher, sont groupées sous le terme de « mûrissement ». L'évolution ultérieure des viandes dépend de la température. On peut schématiquement distinguer trois cas.

2.2.1.1. Évolution d'une viande à température ambiante élevée (25 °C à 40 °C)

Ce sont des températures fréquentes dans les pays tropicaux ou équatoriaux et possibles sous nos climats en saison chaude.

Du fait de l'abaissement progressif du potentiel d'oxydoréduction, prolifèrent successivement :

- des bactéries micro-aérophiles (entérocoques) ;
- *Clostridium perfringens* ;
- d'autres *Clostridium* : *C. sporogenes*, *C. bifermentans*, *C. histolyticum*.

L'implantation de *C. perfringens* s'explique par le fait que, parmi les *Clostridium*, c'est l'espèce la plus tolérante vis-à-vis de l'oxygène. Son métabolisme produit des quantités importantes de substances réductrices. L'abaissement du potentiel d'oxydoréduction qui en résulte autorise l'implantation des autres espèces.

Ces bactéries ont une activité protéolytique intense : les protéines sont hydrolysées, les acides aminés formés sont catabolisés avec production de gaz odorants (ammoniac, mercaptans, indol, hydrogène sulfuré) et de diamines de décarboxylation (putrescine, cadavérine).

Le tissu devient spongieux et malodorant, la couleur change et passe du rouge au lilas puis au gris.

REMARQUES

Aux températures comprises entre 25 °C et 40 °C, le rôle de la flore de surface reste très limité car les bactéries anaérobies prolifèrent plus vite.

La présence de *Clostridium perfringens* en grand nombre dans une viande peut être la cause d'intoxications alimentaires.

2.2.1.2. Évolution d'une viande à température ambiante modérée (15 °C à 25 °C)

C'est une température fréquente sous nos climats. Ces conditions conviennent moins bien aux bactéries anaérobies, mais elles restent présentes et peuvent se développer dans la profondeur d'un morceau de viande de volume suffisant.

La flore d'altération est cependant plus variée que dans le cas précédent, les groupes les mieux représentés, en surface, sont des espèces aérobies : *Pseudomonas*, *Brochothrix* et *Micrococcus* ainsi que les *Lactobacillus* et, en profondeur, les entérobactéries.

2.2.1.3. Évolution d'une viande réfrigérée

Afin de limiter le développement des *Clostridium* et des micro-organismes mésophiles, les viandes sont systématiquement réfrigérées dès l'abattage. Les dégradations surviennent donc plus tardivement et sont le fait de la flore de surface aérobie et psychrotrophe :

- lorsque la surface de la viande est sèche, les conditions sont favorables au développement des moisissures. Apparaissent alors des tâches blanches (*Sporotrichum canis*), vertes (*Penicillium*) ou noires (*Cladosporum herbarum*), des odeurs et une saveur anormales ;
- lorsque la surface de la viande est humide, ce sont les bactéries psychrotrophes qui prolifèrent : diverses espèces de *Pseudomonas* et, à un degré moindre, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*. À partir d'un seuil de 10^7 bactéries par centimètre carré, la viande présente une odeur anormale et sa surface devient visqueuse.

Au-delà du seuil de 10^8 bactéries/cm², la viande se couvre progressivement d'une couche poisseuse et devient grise ou brune : l'oxydation des lipides lui confère une odeur de rancissement.

Ces phénomènes sont liés à l'activité oxydante et protéolytique de la flore aérobie, associée à des fermentations réalisées à partir des substrats glucidiques par des bactéries non protéolytiques, micro-aérophiles ou aéroanaérobies : *Lactobacillus*, streptocoques, *Leuconostoc*, entérobactéries.

Parmi ces fermentations, la fermentation lactique domine.

On parle de **surissement** pour qualifier les modifications organoleptiques qui en résultent.

Dans tous les cas où les conditions d'anaérobiose sont réunies : viande hachée, attendrie, désossée, conditionnée sous film plastique..., un développement lent des *Clostridium* reste possible.

La multiplication conjointe de *Clostridium* non protéolytiques, d'entérobactéries, de certains *Bacillus* peut être à l'origine d'un phénomène de surissement.

Le développement, même limité, de *Clostridium* protéolytiques explique que des phénomènes de putréfaction puissent s'installer après un délai assez important.

Toute dégradation anaérobie d'une viande peut être néfaste sur le plan sanitaire. La prolifération de *Salmonella*, de *Shigella*, de *Yersinia*, de staphylocoques, de *Clostridium*, de *Campylobacter* dans une viande peut engendrer des intoxications alimentaires (voir chapitre IV).

2.2.2. Altérations des poissons et produits de la mer

2.2.2.1. La flore microbienne commensale des produits de la mer

Les espèces microbiennes peuplant les poissons sont bien adaptées aux facteurs de sélection que sont la teneur de l'eau en chlorure de sodium (espèces halophiles) et la température ambiante (espèces psychrophiles et psychrotrophes).

Ce sont surtout des bacilles à Gram négatif appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter* et *Moraxella*. Dans la flore intestinale cependant, les conditions de milieu sont sensiblement différentes de celles de la peau ou des branchies : la concentration en oxygène y est plus faible, les sels biliaires exercent une action inhibitrice sur certaines espèces. C'est pourquoi des différences peuvent être observées dans la composition qualitative de la flore. Les vibrions, en particulier, y sont plus abondants car ils sont anaérobies facultatifs et résistent aux sels biliaires.

Sur les crustacés et dans leur flore intestinale, sont identifiés, en plus des espèces précédentes, des microcoques et des corynébactéries.

Il faut préciser, enfin, que la composition de la flore commensale est sujette à des variations selon les zones et la saison de pêche. Les indications données concernent surtout les poissons des mers froides (merlus, cabillauds, limandes, soles...) pêchés en Mer du Nord ou dans l'Atlantique Nord.

2.2.2.2. Après la capture : de la flore commensale à la flore d'altération

• L'évolution des flores microbiennes

Dès la mort du poisson, l'activité des enzymes du contenu intestinal est à l'origine d'une certaine autolyse des constituants de la paroi digestive. Les acides aminés produits, mais aussi les bases nucléiques, le ribose, différents glucides, permettent le développement de bactéries commensales de l'intestin et sont métabolisés avec production d'inosine, d'acide lactique, d'urée et d'oxyde de triméthylamine (TMAO). Ce dernier, pour certaines bactéries aérobies strictes, peut servir d'accepteur final d'électrons lorsque l'oxygène vient à manquer.

De nouvelles conditions de milieu sont donc ainsi créées, ce qui explique que certaines espèces microbiennes prolifèrent alors que d'autres disparaissent.

L'évolution de la flore est, certes, quelque peu différente selon les poissons, mais, dans le cas général, dès le cinquième jour d'une conservation à +3,5 °C, les flores sont constituées presque entièrement de bactéries du genre *Pseudomonas* et, en particulier, par l'espèce *Pseudomonas putrefaciens* (= *Alteromonas putrefaciens*).

• Support biochimique des altérations

Les produits du métabolisme de la flore d'altération peuvent être classés en trois catégories :

– les amines volatiles : oxyde de triméthylamine, triméthylamine, ammoniac, qui sont à l'origine des odeurs ammoniacales :

– le sulfure d'hydrogène et ses dérivés méthylés : diméthylsulfure ($\text{S} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$), méthyl mercaptan ($\text{CH}_3\text{-SH}$), à l'origine des odeurs putrides ;

– des alcools, des aldéhydes, des esters d'acides gras, responsables d'odeurs « fruitées ».

Ce sont les dérivés du soufre qui participent le plus à la détérioration des qualités organoleptiques et expliquent la plupart des odeurs des poissons altérés.

Les acides aminés produits par l'autolyse inhibent, dans un premier temps, les protéases bactériennes. Leur consommation par la flore d'altération lève ensuite cette inhibition et les bactéries deviennent, par leurs exoenzymes (principalement les protéases), les seuls intervenants d'un processus ininterrompu de transformation des protéines avec production des substances citées.

2.2.2.3. La progression anatomique de la flore d'altération

À partir de la peau, les muscles sont progressivement atteints. Le processus est cependant assez long. Certains poissons plats, recouverts d'une couche visqueuse, offrent une résistance supplémentaire à la prolifération des micro-organismes. C'est peut-être une des raisons de leur meilleure conservation (leur contenu intestinal est aussi plus réduit).

La colonisation de la chair du poisson est, en fait, principalement à point de départ intestinal. Les bactéries s'engouffrent assez facilement dans les lésions de la paroi digestive consécutives à l'autolyse. Le nombre de micro-organismes par gramme de chair est alors progressivement croissant. Le phénomène est d'autant plus rapide que la température ambiante est élevée. Dans le cas d'un poisson réfrigéré dès sa capture, ce nombre atteint 10^8 à 10^9 par gramme après 10 jours de stockage. C'est à partir de ce seuil que les modifications organoleptiques deviennent sensibles.

Il a été préconisé l'éviscération dès la capture afin de ralentir l'atteinte de la chair. Cependant, le procédé, bien que très efficace, présente l'inconvénient d'accroître la contamination, d'où la nécessité de coupler l'éviscération avec un lavage soigné et complet de l'animal. Dans ces conditions, des poissons comme le cabillaud, le merlu, le maquereau, le lieu noir et la plupart des poissons plats, avec stockage sous glace, peuvent être consommés sans inconvénients 10 à 12 jours après la capture.

2.2.3. Altérations du lait

2.2.3.1. Flore microbienne du lait : flore originelle et flore de contamination

Le lait obtenu par une traite aseptique n'est pas stérile. Il contient 1 000 à 5 000 micro-organismes par millilitre, essentiellement des lactobacilles et des streptocoques lactiques commensaux du pis et des canaux galactophores. Rappelons, d'autre part, que le lait peut être contaminé par divers micro-organismes de l'environnement : entérobactéries, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, microcoques, corynébactéries, *Bacillus*..., par l'intermédiaire du matériel de traite et de stockage du lait, par le sol, l'herbe ou la litière.

Des contaminations d'origine fécale peuvent entraîner la présence de *Clostridium*, d'entérobactéries coliformes et, éventuellement, d'entérobactéries pathogènes : *Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobacter*.

Les laits d'animaux malades peuvent, enfin, contenir des germes pathogènes pour l'homme : *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* (agents de mammites infectieuses chez la vache et pathogènes pour l'homme), *Brucella* (agent de la fièvre de Malte), *Bacillus anthracis* (agent du charbon), *Listeria*, ainsi que différents virus. Ceci explique l'importance d'un contrôle sanitaire rigoureux.

Flore constante		Flore accidentelle	
Bactéries des canaux galactophores	Bactéries contaminant le lait pendant et après la traite	Bactéries d'origine fécale	Bactéries présentes sur l'animal malade
<i>Lactobacillus</i> Streptocoques lactiques	<i>Pseudomonas</i> , <i>Flavobacterium</i> , entérobactéries, microcoques, corynébactéries, <i>Bacillus</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> <i>Clostridium</i>	<i>Clostridium</i> Coliformes fécaux <i>Salmonella</i> , <i>Yersinia</i> <i>Campylobacter</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Brucella</i> <i>Listeria</i>

Les bactéries en gras sont responsables d'intoxications alimentaires

Tableau 2 – La flore microbienne du lait

2.2.3.2. Action de la flore du lait

Les bactéries de la flore du lait sont susceptibles d'altérer cet aliment par trois processus principaux pouvant, selon les conditions, être plus ou moins associés.

• Fermentation homo et hétérolactique du lactose avec acidification du lait

Un tel processus conduit à la précipitation de la caséine et à la prise en masse du lait.

Selon la température ambiante, le phénomène sera plus ou moins rapide et les bactéries intervenantes différentes : *Streptococcus lactis* de 10 °C à 37 °C, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* au-dessus de 37 °C.

À des températures inférieures à 10 °C, le processus est plus lent, la prise en masse nécessite un délai relativement important. Le caillot peut être dégradé dans une seconde étape par les espèces psychrotrophes protéolytiques : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, microcoques...

La coagulation du lait, phénomène préjudiciable pour les laits de consommation, constitue la première étape de la fabrication des fromages.

• Protéolyse

La conservation du lait cru, de son recueil jusqu'à sa consommation, est assurée par une réfrigération aux environs de +4 °C. Nous avons vu précédemment que cette température sélectionne les groupes bactériens psychrophiles : *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, certains streptocoques... dont l'activité protéolytique peut s'exercer sur la caséine du lait. Il en résulte une altération lente du lait se traduisant par des modifications organoleptiques : saveur amère, saveur de pomme de terre.

L'activité protéolytique peut aussi se manifester sur le caillé et occasionner des perturbations dans la maturation des fromages.

• Lipolyse

De nombreuses espèces psychrophiles protéolytiques sont aussi lipolytiques et dégradent les globules graisseux du lait. C'est le cas de certains *Pseudomonas*, de *Bacillus cereus*. Les acides gras insaturés résultant de la lipolyse peuvent être oxydés (rancissement).

En marge de ces trois actions principales de la flore microbienne du lait, il convient de mentionner celle qui conduit au « filage ». Le filage résulte de la production par certaines bactéries de substances visqueuses. Ces substances sont des polymères du glucose (dextranes) ou de dérivés azotés du glucose. La principale espèce en cause est *Alcaligenes viscosus*. D'autres bactéries, tel *Leuconostoc mesenteroides*, peuvent cependant produire des mucilages dans le lait. Le lait devient filant, il s'écoule comme un sirop; il peut même former des masses de consistance proche de la gelée.

Notons enfin quelques altérations mineures: *Streptococcus lactis* variété *multigenes* donne au lait un goût de caramel, des micro-organismes pigmentés peuvent colorer le lait en jaune (*Flavobacterium*), en rouge (*Brevibacterium erythrogenes*) ou en bleu (*Pseudomonas syncyanea*).

2.2.4. Altérations des fruits et légumes

2.2.4.1. Flore originelle

La flore microbienne des fruits et des légumes est constituée presque exclusivement de bactéries de l'environnement. Accidentellement, peuvent s'y rajouter des micro-organismes pathogènes provenant de la fumure (fumier), de l'eau ou des manipulations: staphylocoques, entérobactéries pathogènes (*Yersinia*), *Campylobacter*, des parasites ou des virus (*Poliovirus*, virus de l'hépatite A). Ces contaminations sont exceptionnelles.

2.2.4.2. Altérations exercées sur le végétal avant la récolte

Elles sont la conséquence du développement de divers micro-organismes phytopathogènes.

• Les altérations d'origine bactérienne

Elles concernent essentiellement les légumes, car le pH relativement bas des fruits n'autorise pas la prolifération des bactéries. Chez les légumes, l'altération la plus fréquente est la pourriture molle qui se manifeste par le rancissement, le noircissement et le dessèchement combinés des racines et des tubercules.

Deux groupes bactériens peuvent en être responsables: *Erwinia* (qui appartient à la famille des entérobactéries) et *Pseudomonas*.

Des bactéries cellulolytiques et (ou) pectinolytiques peuvent détruire la paroi cellulosepectique (*Cellulomonas*, *Arthrobacter*). Leur action aboutit à produire localement des zones de consistance visqueuse.

• Les altérations d'origine fongique

Elles concernent à la fois les fruits et les légumes. Le développement de leur mycélium entraîne l'apparition de zones colorées, puis la dissociation des tissus sous-jacents. Quelques altérations fongiques parmi les plus fréquentes:

- la pourriture grise due à *Botrytis cinerea*;
- la pourriture bleue ou verte (*Penicillium*);
- la pourriture verte (*Trichoderma*);
- le mildiou ou pourriture blanche (*Phytophthora*);
- la pourriture rose (*Trichothecium*);
- la pourriture rouge (*Fusarium*);
- la pourriture brune (*Sclerotinia*).

La dégradation visqueuse des légumes verts peut aussi être le fait de moisissures cellulolytiques et pectinolytiques: *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus*.

Toutes ces altérations, si elles modifient sensiblement la valeur marchande et les qualités organoleptiques des végétaux, n'ont cependant pas, à quelque rares exceptions près, d'incidence sanitaire car la flore phytopathogène n'est pas dangereuse pour l'homme.

Retenons cependant comme exceptions les cas où un développement mycélien s'accompagne de la production de mycotoxines.

2.2.4.3. Cas particulier des boissons non alcoolisées

La flore originelle des boissons provient essentiellement des fruits et légumes qui en constituent la matière première. Leur traitement en usine accroît généralement la charge microbienne. La concentration en micro-organismes d'un jus fraîchement pressé (en l'absence de tout traitement) est donc souvent élevée. On y trouve des levures, des moisissures, des bactéries parmi lesquelles *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Erwinia*, *Leuconostoc*...

Dans le cas de la production d'un sirop, d'autres contaminants peuvent être apportés par le sucre (levures osmophiles). Plus généralement, du fait des manipulations subies par les matières premières, peuvent être rajoutées des bactéries d'origine fécale.

La composition et les caractéristiques des boissons non alcoolisées sont telles que seules les espèces acidophiles et osmophiles pourront s'y multiplier et engendrer des altérations. Celles-ci peuvent revêtir divers aspects.

- **Fermentation alcoolique indésirable**

Les sucres assimilables des jus de fruits peuvent être transformés en alcool avec production de dioxyde de carbone, sous l'action de levures: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*. Le même phénomène peut être observé pour un sirop, il est dû à l'action de levures osmophiles: *Saccharomyces osmophilus*, *Saccharomyces rouxii*.

Cette altération se caractérise par un dégagement gazeux qui rend la boisson pétillante et lui confère un goût alcoolisé.

- **Fermentation hétérolactique**

Cette fermentation est celle des sucres assimilables par des bactéries acidophiles du genre *Lactobacillus*, avec apparition de goûts ou d'odeurs anormales avec ou sans production de gaz.

- **Fermentation acétique**

Elle est le fait d'*Acetobacter* ou de *Gluconobacter* et entraîne une acidification.

- **Développement de moisissures (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Mucor*)**

Il provoque brunissement, trouble, apparition de formations floconneuses au sein du liquide.

2.3. Utilisation des micro-organismes dans la fabrication d'aliments

2.3.1. Produits laitiers

2.3.1.1. Les laits fermentés ⁽¹⁾

- **Yaourts (yoghourts)**

Selon la définition donnée en 1977 par l'OMS, le yaourt ou yoghourt est le produit de la coagulation par « fermentation lactique acide due à *Lactobacillus bulgaricus* et à *Streptococcus thermophilus* d'un lait ou lait pasteurisé (ou concentré, partiellement écrémé, enrichi en extrait sec...) avec ou sans additif. Les micro-organismes du produit final doivent être viables et abondants ».

La flore des yaourts naturels telle qu'elle a été étudiée en Bulgarie et en Yougoslavie est beaucoup plus variée. On y a isolé et identifié une centaine de souches microbiennes différentes. Certaines d'entre elles sont indésirables car elles modifient l'aspect ou le goût du yaourt. En fait, *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* sont les seules espèces indispensables. Elles acidifient le lait par fermentation homolactique du lactose. L'acide lactique est donc le produit principal de la transformation. Des quantités plus faibles d'autres substances sont présentes: éthanol, éthanal, acétone, butanone 2, et concourent aux qualités organoleptiques du produit.

Lactobacillus bulgaricus possède, en outre, une activité protéolytique et lipolytique modérée et transforme partiellement la caséine et les graisses du lait. Les produits d'hydrolyse de la caséine donnent au yaourt un goût de peptone.

Lactobacillus bulgaricus et *Streptococcus thermophilus* sont des espèces symbiotiques: les acides aminés produits par l'hydrolyse de la caséine stimulent la croissance du streptocoque, tandis que l'acidification engendrée par son développement place *Lactobacillus bulgaricus* dans les conditions optimales de croissance.

Jadis, les yaourts étaient produits en ensemençant du lait du jour avec un yaourt de la veille. L'ensemble était mis à fermenter deux à trois jours dans une panse d'animal à la température du local (et de la saison!).

Aujourd'hui, le lait est pasteurisé etensemencé avec les deux ferments spécifiques du yaourt (*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*). Ces ferments sont les descendants lointains de ceux des premiers yaourts transmis par de multiples réensemencements. L'ensemble est chauffé à 45 °C pendant quelques heures. À la fin de la fermentation, commence la chaîne du froid qui ne doit pas être rompue jusqu'à la consommation.

En fait, l'acidité du produit et l'activité antibiotique des deux espèces microbiennes du yaourt suffisent à contrarier le développement de la plupart des micro-organismes contaminants. C'est pourquoi le yaourt était jadis considéré comme une forme de conservation du lait. On ne retrouve que très rarement des micro-organismes pathogènes dans un yaourt.

- **Autres laits fermentés**

Le kéfir, résultant de l'action combinée de bactéries pratiquant la fermentation lactique (*S. lactis* et *L. bulgaricus*) et de levures donnant de l'éthanol à partir du lactose, est une préparation d'origine balkanique. Des préparations basées sur le même principe existent dans d'autres pays: citons le koumis en Asie centrale et le leben en Egypte.

2.3.1.2. Les fromages

- **Du lait aux fromages: les étapes de leur production**

Les fromages résultent de transformations complexes du lait par les micro-organismes. On peut schématiquement distinguer trois phases se succédant dans le temps.

(1) Voir aussi le chapitre consacré aux laits fermentés dans *Aliments et boissons - Filières et produits* publié dans la même collection.

1 - La production d'un caillé

La prise en masse du lait peut être obtenue de différentes façons :

- par l'activité des bactéries lactiques. Ces bactéries fermentent le lactose et acidifient le lait du fait de la production massive d'acide lactique. Le lait coagule dès que le pH atteint des valeurs inférieures à 4,6;
- par action de la présure. La présure est une enzyme protéolytique catalysant l'hydrolyse de la caséine K en deux fragments : un fragment hydrophile qui passe dans le lactosérum et un fragment hydrophobe. Les fragments hydrophobes s'unissent pour former un gel. La présure est extraite de la caillette de veau. On peut la remplacer par des enzymes d'origine fongiques (*Mucor*);
- par l'action combinée de la présure et des ferments lactiques. Selon la méthode utilisée, le gel possède une texture différente. Celui obtenu par action de la présure est presque uniforme.

L'action de ferments lactiques produit un coagulum friable et spongieux.

Les choix effectués et qui apparaissent dans les protocoles opératoires sont fonction de la texture que l'on souhaite obtenir.

2 - L'égouttage du caillé

Il sert à éliminer le lactosérum. Il peut être lent si l'on veut obtenir des pâtes molles, ou accéléré par divers procédés (découpage, brassage, pression, broyage, cuisson) si l'on cherche à obtenir des pâtes fermes (pressées ou non, cuites ou non). Les fromages frais sont des caillés consommés tels quels ou après addition de stabilisateurs ou d'agents de sapidité. L'égouttage peut être fait par filtration ou par centrifugation (tel est par exemple le cas du « petit-suisse »).

3 - L'affinage

La plupart des fromages sont, en fait, le résultat de transformations microbiennes plus ou moins complexes du caillé. L'ensemble des actions microbiennes qui donnent au fromage son aspect définitif constitue l'affinage.

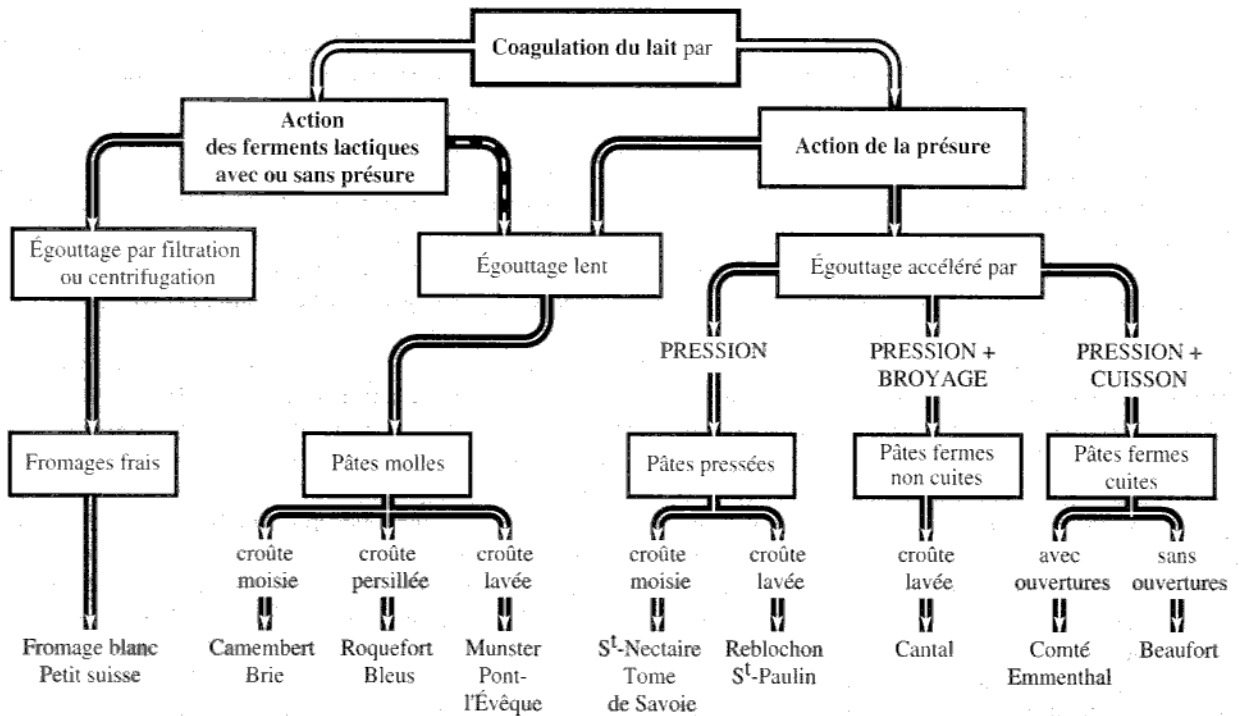


Fig. 3 – Procédés de fabrication des principaux types de fromages

• Origine, nature et rôles des micro-organismes des fromages

Les micro-organismes des fromages ont différentes origines : le lait, l'atmosphère des locaux, le matériel utilisé, la saumure... Ils représentent une population d'environ 10⁶ cellules par gramme. Parmi eux, figurent des bactéries et des champignons microscopiques.

- Les bactéries

Les bactéries lactiques sont présentes dans un lait recueilli de façon parfaitement aseptique. Ce sont donc, en fait, les vraies bactéries du lait, celles de la flore originelle :

- les streptocoques lactiques sont les plus nombreux : *Streptococcus lactis*, *S. cremoris*, *S. diacetylactis*. Leur rôle principal, déjà évoqué par ailleurs, est de produire de l'acide lactique à partir du lactose. Ils produisent aussi de petites quantités d'aldéhydes ou d'acides volatils qui sont des composants d'arôme. Les streptocoques lactiques sont les principaux responsables de la formation du caillé mais ils agissent encore sur le lactose résiduel lors de l'égouttage et même au début de l'affinage. Ils restent, à toutes les étapes de la production, le groupe prédominant ;

- les lactobacilles (*Lactobacillus bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. thermophilus*) sont, pour la plupart, des espèces homofermentaires. Du fait de leur métabolisme particulièrement diversifié, ils participent de façon plus importante que les streptocoques à la production de composés d'arôme. Leur rôle est donc essentiel au cours de l'affinage. Peu représentés dans le lait et le caillé, leur concentration augmente fortement au cours de l'affinage;
- les *Leuconostoc* constituent le troisième groupe important de bactéries lactiques. Leur développement est peu abondant mais leur rôle est essentiel car ces bactéries hétérofermentaires produisent de l'éthanol et des acides organiques à partir du lactose, du diacétyle à partir du citrate. Ils participent donc à la constitution de l'arôme et de la saveur.

Les **bactéries de surface**, présentes en quantité variable dans le lait (selon les conditions de son recueil), sont d'origine exogène et constituent la flore contaminante. Elles sont apportées en quantité appréciable par la saumure.

Certaines sont protéolytiques et interviennent dans la transformation de la caséine puis la dégradation des acides aminés qui en résultent. La plupart sont aussi lipolytiques et participent à la dégradation des triglycérides du caillé avec production d'acides organiques variés.

Les **bactéries propioniques** sont en petit nombre dans le lait. Leur concentration augmente au cours de l'affinage de certains fromages tel l'emmental. Elles fermentent le lactose résiduel avec production d'acide propionique, d'acide acétique et de dioxyde de carbone dont l'accumulation est responsable des trous de l'emmental.

– Les champignons microscopiques

Les levures

Parmi les nombreuses espèces de levures peuplant le lait, seules certaines espèces peuvent se maintenir dans le caillé. Elles produisent des composés d'arôme.

Les moisissures

Elles jouent un rôle très actif dans l'affinage de certains fromages. Citons *Penicillium caseicolum* dans le fromage de Brie, *Penicillium camemberti* et *Geotrichum* dans le camembert, *Penicillium roquefortii* dans les fromages à pâte persillée type roquefort (roquefort, bleu d'Auvergne, fourme d'Ambert, gorgonzola...).

Ces moisissures ont une activité lipolytique et protéolytique intense. La caséine, les graisses du caillé sont métabolisées en un grand nombre de composés concourant largement au développement des qualités organoleptiques du fromage. La plupart consomment l'acide lactique, ce qui désacidifie le fromage et contribue à lui donner sa texture définitive.

• Interaction entre groupes microbiens

Les fromages sont les supports d'écosystèmes dont la composition évolue avec le temps. Les facteurs de sélection qui gouvernent cette évolution sont générés par l'activité métabolique des micro-organismes eux-mêmes. Ceux-ci, à un instant donné, créent, en effet, à la fois les conditions de leur déclin et celles favorisant l'installation d'autres groupes microbiens :

- par la production de substances inhibitrices ou, au contraire, celle de facteurs de croissance;
- par la modification de facteurs physicochimiques, dont le pH.

1^{er} exemple : le fromage de Roquefort

Rappelons, très schématiquement, les étapes de la fabrication du roquefort. On peut en distinguer arbitrairement trois :

- la production du caillé et les opérations sur le caillé avant affinage.

Le lait entier et cru de brebis estensemencé avec une souche sélectionnée de *Penicillium roquefortii*. Le caillé, obtenu en 48 heures environ, est moulé, égoutté, retourné trois fois par 24 heures, d'abord en chambre "chaude" à 18 °C, puis en chambre « froide » à 10 °C, pendant une dizaine de jours;

- le premier affinage suit le salage et dure 3 à 4 semaines;

- le fromage est entouré d'une feuille d'étain, il subit alors un deuxième affinage qui se déroule pendant environ trois mois au terme desquels il peut être commercialisé.

1 – Évolution et interactions des flores microbiennes avant le premier affinage

• Rôle des flores microbiennes dans la production du caillé

Le rôle principal des germes lactiques est, comme dans tout fromage, d'acidifier le lait pour former le caillé.

Deux sortes de streptocoques lactiques ont été isolés dans le fromage de Roquefort : les uns sont fortement acidifiants et coagulent le lait en 24 heures, les autres sont peu acidifiants et parviennent au même résultat en 72 heures au moins.

Leur activité conjuguée entraîne une acidification relativement lente; dans le cas contraire, le caillé s'égoutterait trop rapidement. L'acidification est cependant suffisante pour amener le fromage, en 48 heures, à un pH < 5 pour éliminer tous les germes acido-résistants indésirables.

Le comportement des streptocoques lactiques est différent dans le fromage et au laboratoire. Cette constatation et bien d'autres dont l'exposé sort du cadre de cet ouvrage suggèrent l'existence d'interactions avec d'autres micro-organismes.

Dès les premières heures de la fabrication, la population de levures augmente considérablement puisqu'elle passe de 10² à 10⁵-10⁶ par gramme en 24 heures. Ces levures appartiennent au genre *Saccharomyces* (*S. lactis*). Au cours de la production du caillé, deux types d'interactions interviennent probablement :

interactions levures ↔ streptocoques lactiques

interactions entérocoques ↔ streptocoques lactiques

Dans les deux cas, et selon un mécanisme différent, la capacité d'acidification des souches faiblement acidifiantes de streptocoques lactiques est augmentée.

• Rôle des flores microbiennes dans la formation d'« ouvertures » dans le caillé

Dans les deux premiers jours de la fabrication, une autre population importante se développe; celle des *Leuconostoc*. Deux espèces prédominent: *Leuconostoc dextranicum* et *L. mesenteroides*. La production de gaz par ces bactéries constitue un facteur essentiel pour une évolution favorable du fromage de Roquefort. En effet, pour que *Penicillium roquefortii* puisse se développer dans le fromage et lui donner son aspect persillé caractéristique, il est nécessaire que le caillé soit « ouvert ». Cette ouverture que l'on observe dès le deuxième jour de l'évolution naturelle du fromage est due, en partie au moins, à l'activité des *Leuconostoc*.

Or, les *Leuconostoc*, cultivés en souche pure en laboratoire ou dans un lait stérilisé, ne produisent que peu de gaz; cultivés en présence d'entérocoques (*Enterococcus faecalis*), leur production de gaz est sensiblement augmentée. *Saccharomyces lactis* stimule aussi la production de gaz des *Leuconostoc*. Cette levure, étant elle-même gazogène, elle contribue directement et indirectement à la formation d'ouvertures dans le caillé.

Ces ouvertures résultent donc d'interactions microbiennes que l'on peut schématiser ainsi (voir fig. 4).

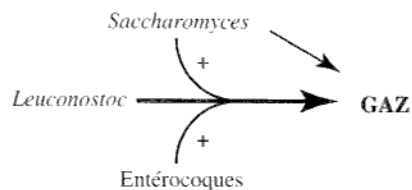


Fig. 4 – Schématisation des interactions microbiennes

• Rôle des flores microbiennes dans l'assainissement du caillé

À la fin de cette première étape, les staphylocoques dorés et les coliformes ont presque totalement disparu. Parmi les *Micrococcaceae*, les bactéries dominantes sont les staphylocoques coagulase-

2 – Évolution et interactions des flores pendant le premier affinage

L'addition de sel est un facteur de sélection qui modifie sensiblement la composition et l'activité des flores microbiennes. Malgré l'action inhibitrice du sel, les streptocoques lactiques persistent cependant; ne se maintiennent que des souches peu acidifiantes. Les levures restent en nombre important, mais leur nature a changé: elles appartiennent essentiellement aux genres *Hansenula* et *Pichia*. Les *Saccharomyces* sont inhibés par le salage. Les entérocoques, bien résistants au sel, se maintiennent. *Hansenula*, *Pichia* et entérocoques exercent très probablement une action stimulante sur la croissance des streptocoques lactiques et leur résistance dans les conditions hypersalées. Parmi les *Micrococcaceae*, les microcoques ont remplacé les staphylocoques coagulase-

3 – Évolution et interactions des flores pendant le deuxième affinage

Après le « plombage », la maturation est dominée par le développement et l'activité de *Penicillium roquefortii*. Ce dernier inhibe la prolifération des levures et des microcoques. Il a été démontré que son développement est stimulé par les streptocoques lactiques sélectionnés par le salage.

La croissance de *Penicillium roquefortii* devient évidente 8 à 10 jours après l'ensemencement. Son développement est maximal après un affinage de 1 à 3 mois. Le champignon intervient en désacidifiant le caillé par la consommation de l'acide lactique (fourni par l'activité des streptocoques lactiques). C'est le principal responsable de la maturation du fromage dans lequel il intervient par ses enzymes protéolytiques et surtout lipolytiques. Le système lipolytique de *Penicillium roquefortii* comprend des lipases qui hydrolysent les triglycérides en libérant une quantité notable d'acides gras à courtes chaînes (acides caprique, caproïque, caprylique...) qu'il transforme successivement en cétones (heptanone 2, pentanone 2, nonanone 2...) et en alcools secondaires (heptanol 2, pentanol 2, nonanol 2...). Les différents produits de ces transformations sont responsables de l'arôme très particulier du fromage de Roquefort. Il est probable, cependant, que l'activité d'autres micro-organismes contribue aussi à l'élaboration de ses qualités organoleptiques, en particulier celle des levures qui persistent très longtemps dans le fromage et sont capables de produire des facteurs d'arôme.

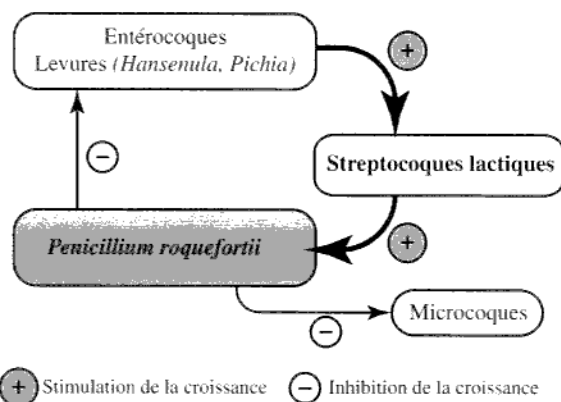


Fig. 5 – Interactions entre *Penicillium roquefortii* et les autres micro-organismes

2^e exemple: le camembert

L'acidité du caillé et sa production sont essentiellement le fait de l'activité de *Streptococcus lactis*. Nous avons vu que cette bactérie prédomine dans le caillé. Dès le troisième jour, les micro-organismes acidophiles s'implantent, principalement les levures et *Geotrichum candidum*. Les levures prolifèrent en surface jusqu'au dixième jour, puis leur concentration diminue. Le rôle principal est ensuite joué par *Penicillium camembertii* qui s'installe dès le cinquième jour, forme un feutrage duveteux à la surface du fromage et consomme l'acide lactique. Le pH du milieu augmente, les conditions sont alors réunies pour la prolifération des micro-organismes de surface qui représentent, en fin d'affinage, la flore dominante avec *S. lactis*

Document 1 – Deux exemples des interactions entre micro-organismes dans la fabrication des fromages

• Mécanisme sommaire des transformations du caillé: rôle des micro-organismes dans l'affinage

L'arôme et la saveur d'un fromage résultent de la production de multiples substances à partir des constituants du caillé. Les caractéristiques organoleptiques sont, en fait, moins fonction de la nature des produits que de leurs proportions respectives au sein du produit fini.

Nous savons que, sous l'action des ferments lactiques, le lactose peut subir des transformations débouchant sur la production de composants d'arôme ou contribuant à la saveur du fromage.

Il en est de même des protéines et des matières grasses du caillé.

– Les protéines

Elles sont métabolisées par:

– les enzymes protéolytiques du lait;

– de la présure;

– des enzymes bactériennes ou mycéliennes.

La part relative de chacun de ces facteurs dépend de la nature de la pâte sur laquelle ils s'exercent. Dans les fromages de type comté, ce sont les enzymes protéolytiques bactériennes qui jouent le rôle principal. Dans les cas du camembert, du roquefort, des « bleus », ce sont les enzymes des *Penicillium* qui sont les plus actives, pour le saint-paulin c'est la présure.

Selon les cas, le caillé sera plus ou moins complètement métabolisé. La teneur en azote soluble est, par exemple, de 16 % (par rapport à l'azote total) dans le saint-paulin, 30 % dans un comté, 45 à 50 % dans un roquefort.

Les acides aminés produits peuvent être décarboxylés (par des microcoques, *Brevibacterium*...), désaminés (par des moisissures: *Geotrichum*) avec production de plus ou moins d'ammoniac. Les chaînes latérales peuvent être séparées avec production de phénols, de composés soufrés, d'indole...

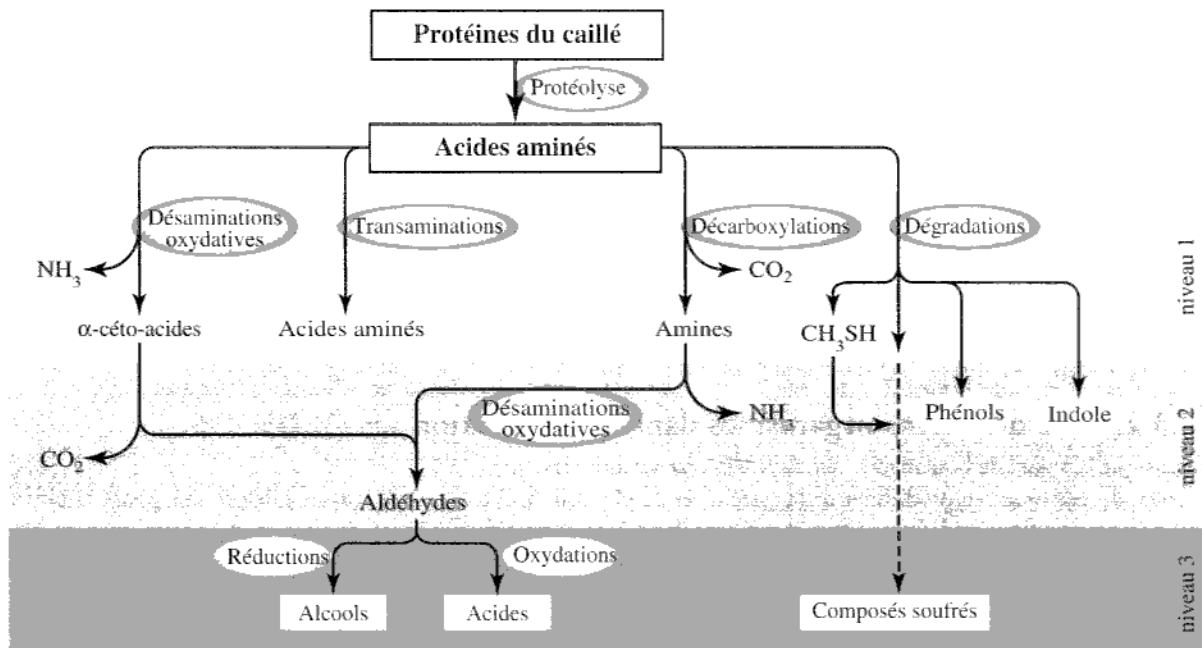


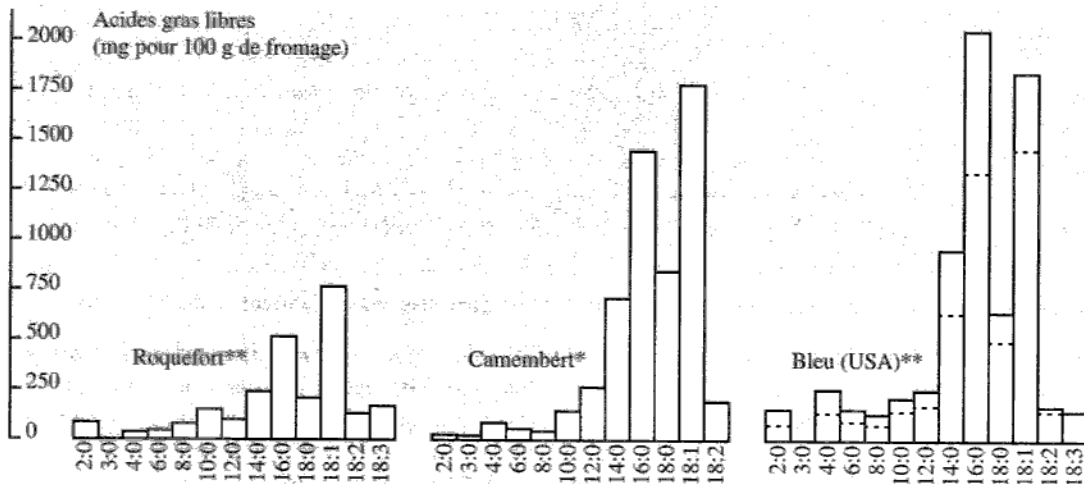
Fig. 6 – Schéma général du catabolisme microbien des acides aminés au cours de l'affinage des fromages (d'après Hemme et al., 1982)

– Les triglycérides

Ils sont transformés plus ou moins complètement en acides gras, en glycérol, mono et diglycérides. La nature et la concentration des acides gras présents dans un fromage (on parle de profil d'acides gras) sont souvent très représentatives du type de fromage.

Ces acides gras peuvent être à leur tour catabolisés en méthylcétones, en alcools...

Tous ces composés sont à l'origine de la « saveur » du fromage qui représente à la fois sa saveur et son arôme.



* d'après Kuzdzal-Savoie et Kuzdzal (1966) - ** d'après Anderson et Day (1965)

Fig. 7 – Comparaison des profils des principaux acides gras libres des camemberts et des bleus

mg/kg de fromage bleu				
longueur de la chaîne	A	B	C	D
C ₅	1,3 - 142,0	3,6 - 20,9	6,5 - 20,9	3,6 - 19,2
C ₇	4,8 - 100,0	17,6 - 71,0	17,9 - 71,8	17,6 - 69,9
C ₉	3,9 - 145,0	19,8 - 88,3	19,8 - 88,3	13,9 - 78,9
C ₁₁	tr - 20,3	2,4 - 29,9	4,9 - 29,9	2,4 - 6,7

Données bibliographiques (valeurs minimales et maximales citées dans chaque travail).
 A: fromage Normanna (Svensen, Ottestad, 1969) – 22 échantillons;
 B: Roquefort (Schwartz *et al*, 1963) – 3 échantillons;
 C: Roquefort (Anderson, Day, 1966) – 2 échantillons;
 D: Bleu américain (Anderson, Day, 1966) – 5 échantillons.

d'après A. Gallois et D. Langlois – *Le lait*, 1990, 70 – p.89-106.

Tableau 3 – Quantités de méthyl-cétones trouvées dans différents fromages bleus

• Tradition et modernisme

Jadis, l'ensemencement du lait était laissé au bon vouloir de la nature. Il en est encore de même pour de nombreuses productions artisanales (qui n'en sont pas de moindre qualité). L'isolement, la culture et la conservation des souches microbiennes intervenant dans le processus, une connaissance plus approfondie des interactions microbiennes et de l'évolution des flores au sein des fromages, ont conduit à des pratiques moins empiriques.

La pasteurisation du lait, en éliminant aussi bien les micro-organismes indésirables que les ferments lactiques, rend obligatoire son ensemencement par des levains sélectionnés dont la composition varie avec le type de fromage. Cette technique est aussi appliquée à partir de laits crus.

Les levains lactiques sont des cultures renfermant environ 400 milliards de bactéries par gramme. D'autres micro-organismes sont, selon les cas, ensemencés à la périphérie ou dans la profondeur du caillé. Les bactéries utilisées sont sélectionnées en fonction de leurs caractères métaboliques et de leur résistance aux micro-organismes.

Ainsi, des processus aussi complexes que ceux qui ont été décrits au cours de ce chapitre sont aujourd'hui suffisamment maîtrisés pour être reproduits et contrôlés. La production d'un fromage est devenue une biotechnologie à part entière.

2.3.2. Rôle des micro-organismes dans la panification

Rappelons que la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae* intervient :

- au cours du pétrissage en produisant de la cystéine et du glutathion. Il en résulte la rupture de certains ponts disulfure (-S-S-) et une modification de la structure du gluten, donc de la texture de la pâte ;
- après mélange et pétrissage de la pâte, en dégradant les sucres pour les transformer en alcool et dioxyde de carbone, ce qui a pour effet de faire lever la pâte.

Au cours de la cuisson, l'alcool s'évapore mais les bulles de dioxyde de carbone persistent donnant au pain sa texture définitive.

2.3.3. Autres aliments fermentés

Les fermentations microbiennes associées à la saumure ont été depuis longtemps et sont encore utilisées dans le but de conserver un aliment. C'est toujours le cas, par exemple, des olives et des concombres (*voir chapitre VI - 4.2.*).

Les fermentations microbiennes de certains aliments bruts, souvent des légumes, peuvent être recherchées aussi pour en améliorer le goût, la saveur et la valeur nutritive. Cette pratique est courante au Japon et en Asie du Sud-Est ; les tempes en sont un exemple.

2.3.3.1. Quelques aliments fermentés exotiques

Un **tempeh** se présente sous la forme d'un gâteau de matière végétale entièrement recouvert et pénétré par le mycélium d'un champignon appartenant au genre *Rhizopus*. Selon la nature du végétal utilisé, on distingue différents tempehs : le tempeh kedele est produit en Indonésie à partir du soja (kedele signifie soja en indonésien), le tempeh enthoë est fabriqué avec de la noix de coco, le tempeh bongkreg katjan à partir d'arachides.

De nombreuses variantes existent : au Japon, ce sont des graines de soja qui sont soumises à l'action d'*Aspergillus oryzae*. La fermentation qui en résulte fournit la **natto**. En Chine, le soja est transformé par un champignon du genre *Mucor* pour fournir le **sufu**.

La sauce de soja, enfin, résulte de la fermentation d'un mélange salé de soja et de blé par *Aspergillus oryzae*. La préparation obtenue (le **koji**), additionnée de saumure, est mise à fermenter un an en cuve. L'ensemble est pressé pour donner la sauce de soja, produit largement répandu dans tous les pays orientaux.

2.3.3.2. Un aliment fermenté bien de chez nous : la choucroute

Les choux, coupés et salés, sont mis à macérer puis à fermenter. Le salage sélectionne parmi la flore originelle les micro-organismes utiles dans le processus. Il s'agit d'une fermentation hétérolactique dans laquelle *Leuconostoc mesenteroides* puis *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus brevis* jouent le rôle essentiel.

D'autres micro-organismes interviennent pour donner des composés d'arôme.

Les choux fermentés subissent ensuite une cuisson.

2.3.4. Le cas particulier des boissons alcoolisées

Diverses boissons alcoolisées sont obtenues par fermentation alcoolique de jus sucrés sous l'action de levures. Les procédés sont très anciens : on les maîtrisait déjà il y a 6000 ans !

Selon la matière première utilisée, on peut les classer en deux groupes :

- 1^{er} groupe : le produit de départ contient des sucres fermentescibles en quantité suffisante, il s'agit en général de jus de fruits. C'est le cas du vin et du cidre. La fermentation alcoolique suit immédiatement la production du jus résultant, selon les cas, d'un foulage ou d'un pressage du fruit. Elle s'arrête lorsque le degré alcoolique est suffisant pour détruire les levures les plus alcoologènes (donc les plus résistantes à l'action antiseptique de l'alcool) ;
- 2^e groupe : la matière première ne contient pas de sucres fermentescibles mais des polyosides (en général, l'amidon) susceptibles d'en donner par hydrolyse enzymatique. L'opération doit donc être conduite en deux étapes :
 - hydrolyse des polyosides en sucres fermentescibles,
 - fermentation alcoolique du jus sucré obtenu.
 C'est le cas de la bière ou du saké.

2.3.4.1. Rôle des micro-organismes dans la vinification

• Une étape préalable : la production du moût

Le raisin, dès la cueillette, est foulé de façon à en exprimer le jus. Dans le cas de la production d'un vin rouge, le jus est laissé en contact avec la peau, les pépins et la rafle. Pour produire un vin blanc, le jus est mélangé avec le produit du pressage des autres constituants de la récolte. Dans les deux cas, cette opération conduit à l'obtention d'un moût.

• Transformations du moût au cours de la vinification : principales étapes, bilan global, différents processus

Le moût est mis à fermenter en cuve. La fermentation est intense, elle se traduit par un dégagement important de dioxyde de carbone et conduit au moût de vinification qui est égoutté, pressé puis placé en cuves pour une maturation au cours de laquelle les lies seront régulièrement soutirées.

Composition chimique du moût obtenu par foulage (en g/L)

Acide tartrique et acide malique	2 à 5
Glucose et fructose	100 à 250
Acides organiques combinés (bitartrates)	3 à 10
Sels minéraux	2 à 3
Matières azotées et pectiques	0,5 à 1

Les constituants essentiels du jus de raisin sont donc les oses et les acides organiques.

Composition chimique d'un vin

Éthanol	6 à 17 % en volume
Éthanal	0,005 à 0,6 g/L
Esters	0,5 à 1,5 g/L
Acide acétique	0,3 à 0,5 g/L
Acide tartrique	5 à 10 g/L
Acide lactique	0 à 1 g/L
Acide succinique	1 à 3 g/L
Sucres	1 à 2 g/L
Glycérol	5 à 12 g/L
Tanins	0,4 à 4 g/L
Sels minéraux	1 à 3 g/L

On voit que les sucres et l'acide malique du jus de raisin n'entrent plus dans la composition du vin. Celui-ci renferme, par contre, des substances nouvelles comme l'éthanol et le glycérol quantitativement prépondérants, mais aussi des acides organiques parmi lesquels l'acide lactique et divers esters.

La vinification résulte de transformations microbiennes du moût. Les deux principales sont :

- la **fermentation alcoolique** pratiquée par les levures qui utilisent les sucres du moût pour les transformer en éthanol, en glycérol et, secondairement, en divers acides organiques ;
- la **fermentation malolactique** conduite par diverses bactéries et au cours de laquelle l'acide malique est transformé en acide lactique.

• Fermentation alcoolique et vinification

– Principales levures intervenant dans la vinification

On observe une sélection naturelle. De nombreuses espèces de levures se trouvent sur la peau du grain de raisin mûr ; leur dissémination est due à l'activité d'insectes et surtout à celle des Drosophiles. La plupart de ces espèces disparaissent de l'environnement après les vendanges. Certaines, cependant, subsistent à l'état de spores dans le sol. L'année suivante, elles pourront ensemercer à nouveau les grains du raisin.

Dans les régions viticoles, sont ainsi naturellement sélectionnées les levures les mieux adaptées au climat et aux cépages utilisés. À chaque type de vin, correspondent quelques espèces de levures. Il fut tentant de vinifier des jus issus de cépages et de terroirs ordinaires avec les levures de vins de Bordeaux ou de Bourgogne. Les résultats furent loin d'être concluants.

– Les levures d'intérêt œnologique

Elles se différencient par :

- leurs caractères morphologiques et physiologiques ;
- les sucres qu'elles sont susceptibles de fermenter ;
- leur rendement en alcool mesuré par la masse de sucre nécessaire pour obtenir un degré d'alcool ;
- leur pouvoir alcoologène défini par le degré alcoolique maximum pouvant être obtenu avec la levure considérée.

Parmi les levures sporogènes d'intérêt œnologique, citons :

- *Saccharomyces ellipsoideus*, de forme ovalaire et au pouvoir alcoologène élevé (17°) ;
- *Saccharomyces oviformis* dont le pouvoir alcoologène est encore plus élevé ;
- *Torulospira rosei*, petite levure ronde, au pouvoir alcoologène modéré qui peut faire fermenter lentement de grandes quantités de sucres.

Parmi les levures asporogènes, *Kloeckera apiculata* est la plus répandue. Elle représente avec *S. ellipsoideus* 80 à 90 % de l'ensemble des levures du moût de raisin. *K. apiculata* possède un pouvoir alcoologène faible (4 à 5 %), un mauvais rendement en alcool et engendre la production d'acides volatils en général indésirables.

– Évolution de la flore du moût au cours de la fermentation alcoolique

Plusieurs espèces de levures se succèdent dans le temps ; l'ordre de leur intervention est fonction de leur pouvoir alcoologène.

La teneur du moût en éthanol est, en effet, le facteur de sélection le plus important. Avec le temps, le degré alcoolique s'accroît et sont sélectionnées des espèces dont le pouvoir est de plus en plus élevé.

Le départ de la fermentation est assuré par *Kloeckera apiculata* qui produit les premiers degrés d'alcool. Puis se succèdent au sein du moût diverses levures du genre *Saccharomyces*. En fin de fermentation, l'espèce dominante est *Saccharomyces ellipsoideus*. *S. oviformis*, « levure finisseuse » produit les derniers degrés.

– Les produits de la fermentation alcoolique

Le produit principal est l'éthanol. Cependant, dès 1860, Pasteur montrait que 5 % du sucre étaient transformés en d'autres produits de fermentation dont le glycérol et l'acide succinique. On sait, depuis, que les produits secondaires de la fermentation alcoolique sont beaucoup plus variés.

Au sein d'un moût, l'activité fermentaire des levures conduit à la production d'éthanal, d'acide acétique, d'acide citrique, de butane-diol.

À partir des acides aminés contenus dans le moût, les levures produisent des alcools dits supérieurs tels l'alcool isamylique ou l'alcool isopropylique. Ce sont les composants essentiels du bouquet secondaire d'un vin.

Les acides organiques et les alcools formés au cours du processus de vinification peuvent se combiner pour donner des esters. Ces esters sont responsables du bouquet tertiaire d'un vin ; leur teneur augmente avec le temps. La production d'esters est un des paramètres du vieillissement d'un vin.

• La fermentation malolactique

Lorsqu'on abandonne du moût de raisin à la fermentation spontanée, on observe, soit à la fin de la fermentation alcoolique, soit après un délai plus ou moins long, une baisse d'acidité. Celle-ci s'accompagne toujours de la disparition de l'acide malique et de l'augmentation de la teneur du moût en acide lactique.

Dans le même temps, se développent dans le vin des bactéries capables de transformer l'acide malique (qui est un diacide) en acide lactique (monoacide). Les agents de cette fermentation appartiennent au genre *Enococcus*, principalement l'espèce *Enococcus oeni*.

Le mécanisme de la fermentation malolactique est schématisé par la *figure 8*.

Il est possible de passer de l'acide malique à l'acide lactique par une simple décarboxylation (1).

Les bactéries semblent emprunter un chemin différent (2).

– Intérêt œnologique de la fermentation malolactique

C'est une fermentation d'achèvement. Lorsque tout l'acide malique est dégradé, le vin est biologiquement stable. On considère comme raisonnable un délai de deux ans après la fermentation alcoolique.

C'est une fermentation d'affinement. L'acide malique, dont le goût est très prononcé, est remplacé par l'acide lactique moins agressif. L'acidité diminue. Le vin acquiert plus de souplesse.

La fermentation malolactique est indispensable à l'élaboration d'un bon vin rouge, surtout s'il est destiné à être gardé.

Elle n'est, en général, pas souhaitée pour les vins blancs, sauf dans les cas de vendanges trop acides.

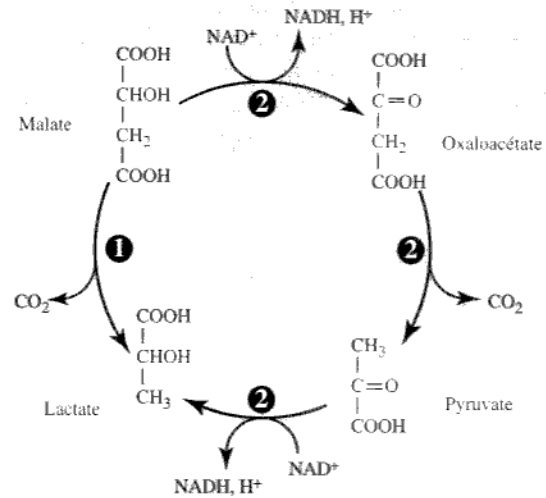


Fig. 8. Fermentation malolactique

2.3.4.2. Production du cidre

Le cidre est obtenu par fermentation d'un jus sucré obtenu par le pressage de pommes.

La microbiologie du cidre est voisine de celle du vin. Les levures intervenant dans la fermentation alcoolique sont :

- soit apiculées du genre *Kloeckera*;
- soit non apiculées elliptiques : *Saccharomyces uvarum* et *Saccharomyces ellipsoideus*.

Ces levures sont celles retrouvées normalement sur les pommes. Une fermentation malolactique, qui est le fait de *Lactobacillus* hétérofermentaires, est presque toujours observée.

Le cidre est une boisson à faible teneur en alcool (2° à 3°).

2.3.4.3. Production de la bière

La bière est le produit d'une fermentation alcoolique de grains d'orge germés, une aromatisation étant apportée par le houblon.

Sa préparation peut être schématiquement présentée en 4 étapes.

• 1^{re} étape : le maltage

Au cours de cette opération, l'orge est transformée en orge germée ou malt. Le maltage a pour but :

- de développer dans le grain les enzymes capables de transformer l'amidon en maltose, ainsi que diverses protéases dégradant les protéines du grain en acides aminés ;
- de permettre les transformations physiques du grain, lui conférant une friabilité facilitant l'action des enzymes.

Au cours du maltage, l'orge subit un trempage de deux à trois jours. Il est ensuite acheminé vers des germoirs mécaniques sous une grande épaisseur. L'oxygénation, l'élimination du dioxyde de carbone, le refroidissement sont assurés par un courant d'air saturé d'eau.

• 2^e étape : le brassage

Il a pour intérêt d'obtenir, à partir du malt additionné de houblon, un moût sucré et aromatique sur lequel s'exercera ultérieurement la fermentation alcoolique par la levure de bière.

Le malt est concassé. Le mélange d'écorce et de farine de malt obtenu est placé dans une cuve en cuivre dans laquelle il est amené par paliers à la température de 75 °C. Dans ces conditions, l'activité des enzymes est optimale : l'amidon et les protéines du malt sont entièrement dégradés.

Après filtration, on obtient un premier bouillon qui est mis en présence de houblon. L'ensemble est soumis à une cuisson au cours de laquelle les principes du houblon sont dissous, en particulier les résines (qui confèrent à la bière son amertume) et les tanins (qui contribuent à l'éclaircir en floculant une partie de la matière organique en suspension). Le moût est prêt pour subir la fermentation alcoolique.

• 3^e étape : la fermentation alcoolique

Le moût est alorsensemencé avec de la levure de bière : *Saccharomyces cerevisiae*. Dans un premier temps, on constate un important dégagement de dioxyde de carbone qui entraîne en surface une mousse abondante, utile pour retenir une partie des substances amères du houblon. Cette fermentation s'accompagne d'un fort dégagement de chaleur qu'il convient de freiner pour obtenir des bières de qualité.

La fermentation s'arrête 6 à 12 jours après l'ensemencement. La plupart des levures floculent alors.

• **4^e étape: la maturation**

La bière est transférée dans des tanks hermétiques dans lesquels elle subit, pendant un ou deux mois, à basse température, une lente transformation due aux fermentations des levures résiduelles.

Elle acquiert alors ses qualités organoleptiques définitives. Une filtration est nécessaire pour la clarifier et une pasteurisation la stabilise en détruisant la totalité des levures résiduelles.

CHAPITRE IV

INFECTIONS ALIMENTAIRES D'ORIGINE MICROBIENNE

1. Définitions et caractères généraux

Le vocabulaire officiel, dans un souci de simplification, regroupe sous le terme de **toxi-infection alimentaire (TIA)** l'ensemble des accidents résultant de l'ingestion d'un aliment contaminé par des micro-organismes pathogènes.

Une **toxi-infection alimentaire collective (TIAC)** est définie par l'apparition d'au moins deux cas similaires d'une symptomatologie dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

Le rôle de l'aliment dans la transmission d'agents microbiens infectieux peut être :

- uniquement **passif**, l'aliment n'est alors qu'un simple véhicule de micro-organismes. L'exemple le plus classique est celui des brucelloses ;
- **actif**, c'est le cas général. L'aliment est le siège d'une multiplication des agents pathogènes avec ou sans production de toxines.

La contamination étant presque toujours paucimicrobienne, elle ne représente qu'un risque potentiel qui ne devient risque réel qu'après la multiplication microbienne dans l'aliment.

Certains facteurs favorisent cette multiplication.

• La température

La plupart des micro-organismes responsables de TIA sont mésophiles et ne se développent activement qu'entre 20 et 40 °C. Les refroidissements trop lents ou les conservations à température ambiante ainsi que toute rupture de la chaîne du froid sont donc néfastes. Il existe, cependant, des exceptions importantes à ce principe : *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* et *Clostridium botulinum* E sont soit cryophiles, soit psychrotrophes et peuvent se multiplier à + 4 °C. Rappelons que, en dessous de 0 °C, il n'y a pas ou peu de destruction microbienne mais stabilisation de la flore.

• Le temps

La multiplication des micro-organismes est d'autant plus importante que le délai entre la cuisson et la consommation de l'aliment est long ou que les matières premières stabilisées sont conservées plus longtemps.

• L'atmosphère autour de l'aliment

L'anaérobiose des conserves ou de certaines préparations liquides ou semi-liquides favorise le développement de bactéries anaérobies si leurs spores n'ont pas été détruites par la chaleur.

La plupart des agents pathogènes responsables de TIA présentent un tropisme intestinal (en général, ils sont capables d'adhérer à la muqueuse intestinale). Selon leur nature, les troubles observés sont à relier à l'aptitude de ces micro-organismes à se multiplier dans la muqueuse (bactéries entéroinvasives) ou à sécréter une toxine modifiant le fonctionnement des entérocytes (bactéries entérotoxiques).

2. Agents infectieux responsables de toxi-infections alimentaires

2.1. Micro-organismes agissant principalement par leur pouvoir invasif

2.1.1. Mécanisme physiopathologique des TIA à tropisme intestinal

2.1.1.1. Le modèle *Shigella*

La colonisation de la muqueuse intestinale par les *Shigella* peut être schématiquement décomposée en plusieurs étapes.

- Le passage de la barrière du mucus (fig.1)

Le mucus oppose trois obstacles à la progression des germes invasifs et s'oppose à leur adhérence :

- un gel de haute viscosité rendant son approche difficile ① ;
- un milieu nutritif particulier nécessitant un équipement enzymatique adapté ② ;
- une haute concentration en immunoglobulines ③ retenues par ce gel au contact de l'épithélium ④.

Passé ces trois obstacles, le germe devra sécréter son facteur d'adhésion pour rester au contact de l'entérocyte ⑤.

- L'adhésion à la membrane des entérocytes (fig.1 et 2)

Seules les bactéries entéro-pathogènes sont capables d'adhérer à l'épithélium du jéjunum ou du côlon. Elles le font au niveau apical, par une liaison entre un récepteur membranaire et une structure bactérienne de surface ① de la fig.2.

- La pénétration intra-entérocytaire (internalisation) (fig.2)

L'adhésion bactérienne est suivie de la formation d'une vésicule d'endocytose emprisonnant les germes. Ce sont en fait les bactéries elles-mêmes qui induisent la formation de la vésicule, les entérocytes sont, en effet, dépourvus de propriétés de phagocytose ② et ③.

- Destruction de l'entérocyte et propagation du processus invasif (fig.2)

Cette vésicule est rapidement détruite et libère les bactéries dans le cytoplasme où les *Shigella* se multiplient ④. La mort cellulaire résulte de l'action d'une toxine protéique inhibant les synthèses protéiques et provoquant la fuite d'eau et d'électrolytes.

La cellule détruite, les bactéries envahissent les cellules voisines ⑤. Ainsi, l'infection se propage-t-elle horizontalement. Dans un deuxième temps, se produit une extension verticale de l'infection ⑥ : le chorio (tissu conjonctif) est atteint, une réaction inflammatoire plus ou moins intense se développe du fait de l'irrigation importante de cette zone (les polynucléaires quittent les vaisseaux pour se diriger sur le lieu de l'infection). Il se forme des micro-abcès et des ulcérations de la muqueuse. Dans la plupart des cas, les *Shigella* ne passent pas dans le sang car la réaction inflammatoire est suffisante pour les éliminer. Ceci explique la régression des troubles en 24 à 48 heures. La coproculture (recherche des germes dans les selles) est positive, l'hémoculture est négative.

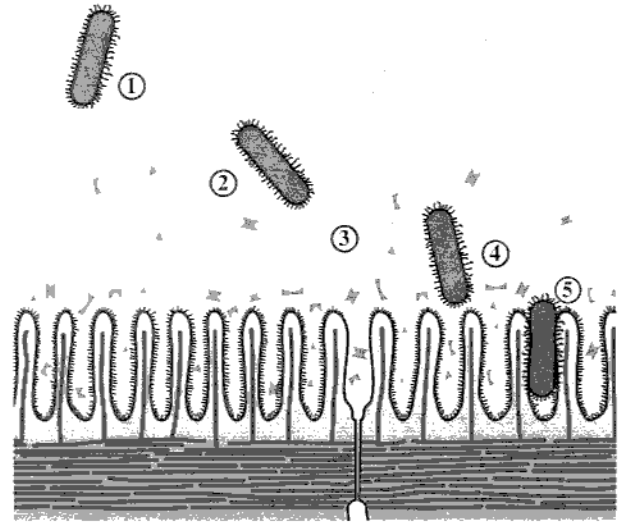


Fig. 1 – Rôle du mucus dans la protection de la muqueuse intestinale contre l'adhésion de bactéries pathogènes

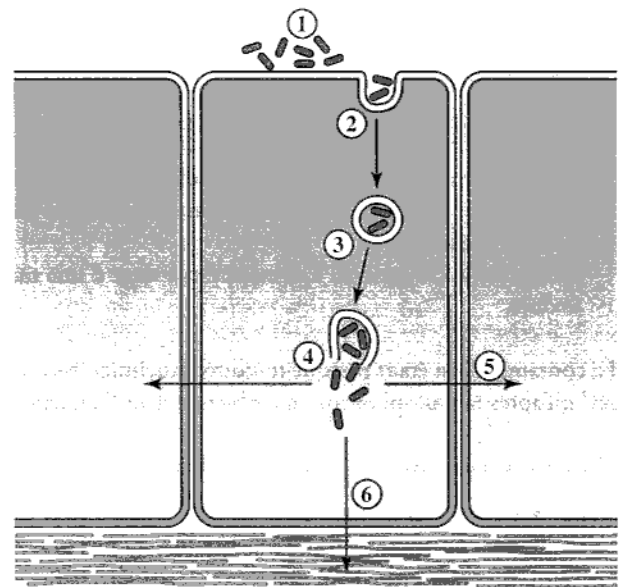


Fig. 2 – Mécanisme des toxi-infections alimentaires à tropisme intestinal, mettant en jeu des *Shigella*

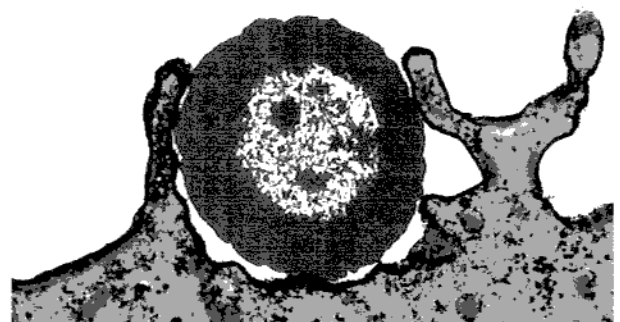


Fig. 3 – Entrée par phagocytose induite de *Shigella flexneri* dans une cellule épithéliale HeLa. (Notez la formation de pseudopodes aboutissant à l'internalisation de la bactérie)

2.1.1.2. Le modèle *Salmonella*

L'invasion de la muqueuse intestinale par les *Salmonella* requiert, comme pour les *Shigella*, l'adhésion des bactéries à des récepteurs cellulaires spécifiques. Un des sites de l'adhésion est le récepteur cellulaire à l'EGF (*epithelial growth factor*). La fixation des *Salmonella* sur ce récepteur active une protéine-kinase, la phosphorylase A2, et déclenche ainsi une série de réactions aboutissant au remaniement du cytosquelette. On note le gonflement des microvillosités; une vacuole d'endocytose se forme, les *Salmonella* s'y multiplient. La vacuole migre vers la membrane latérobasale et est expulsée de la cellule. Les bactéries sont prises en charge par les macrophages des follicules lymphoïdes et des ganglions mésentériques. Si elles sont éliminées, l'infection reste localisée et n'atteint pas le stade de la septicémie (coproculture positive et hémoculture négative). Dans le cas inverse, les *Salmonella* sont déversées dans le sang et sont responsables d'un épisode septicémique (coproculture et hémoculture positives).

On n'observe pas, contrairement aux *Shigella*, la destruction des entérocytes. La réaction inflammatoire est moins intense.

2.1.1.3. Le modèle *Yersinia*

Yersinia enterocolitica pénètre dans la muqueuse par les plaques de Peyer et se concentre dans le tissu lymphoïde en restant toujours en position extracellulaire; les bactéries ne sont pas internalisées. Lorsque *Yersinia* adhère à une cellule hôte (macrophage par exemple), son plasmide code pour une douzaine de protéines regroupées sous le terme générique « YOP ». Certaines de ces protéines provoquent la translocation dans la cellule des autres protéines qui exercent différents effets cytotoxiques. *Yersinia* neutraliserait ainsi les défenses immunitaires de l'intestin.

Par ailleurs, le fer est un élément indispensable à l'expression du pouvoir invasif de *Yersinia enterocolitica*. Les sérotypes entéropathogènes 0₃ et 0₄ sont capables de produire des sidérophores ayant une forte affinité pour le fer.

2.1.2. Agents étiologiques

2.1.2.1. *Salmonella*

• Position taxonomique

Les *Salmonella* sont des bacilles à Gram-, cultivant bien sur les milieux ordinaires, appartenant à la famille des entérobactéries. Avec ces dernières, elles ont en commun de fermenter le glucose, de réduire les nitrates en nitrites et d'être dépourvues d'oxydase. Leur identification différentielle repose essentiellement sur leur capacité à produire du sulfure d'hydrogène H₂S (il y a des exceptions), la possession d'une lysine-décarboxylase, l'absence d'uréase et de tryptophane-désaminase.

Le genre *Salmonella* comprend une seule espèce: *Salmonella enterica*. Plus de 2 200 sérovars ont été, à ce jour, isolés, ils se différencient par leurs antigènes de paroi (antigènes O) et leurs antigènes flagellaires (antigènes H).

• Physiopathologie et symptomatologie des salmonelloses

Les salmonelloses peuvent être classées en deux catégories:

- les **fièvres typhoïde et paratyphoïdes**, dues à des sérovars strictement humains: *Salmonella* Typhi, *S. Paratyphi* A et, à un degré moindre, *S. Paratyphi* B. La transmission est essentiellement interhumaine et se fait par l'eau et les aliments souillés;
- les **toxi-infections alimentaires et gastro-entérites du nourrisson**, dues à des sérovars ubiquitaires, donc pouvant transiter chez l'homme et chez l'animal. C'est cet aspect de la pathologie des *Salmonella* que nous développons, bien que les aliments puissent être aussi incriminés dans les salmonelloses « majeures ».

Quelques sérovars ont une incidence particulière: essentiellement *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, mais aussi *S. Dublin*, *S. Hadar*, *S. Agona*, *S. Montevideo*, *S. Saint-Paul*, *S. Thompson*, *S. Virchow*, *S. Newport*... Cependant, toute *Salmonella*, quel que soit son séovar, peut être responsable de toxi-infections.

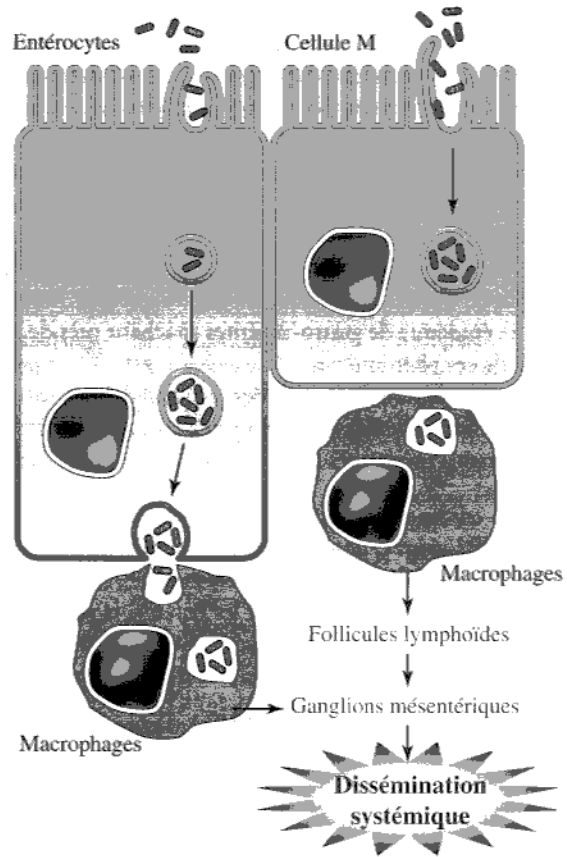


Fig. 4 – Mécanisme du pouvoir d'invasion des *Salmonella*

Le pouvoir pathogène des *Salmonella* ubiquitaires est, en règle générale, moindre que celui des sérovars strictement humains. Chez l'adulte, une ingestion massive est en général nécessaire pour engendrer une infection (environ 10⁶ par gramme). Cependant, cette notion de charge bactérienne minimale n'est pas toujours vérifiée. Chez le très jeune enfant, le vieillard, les sujets gastrectomisés, des valeurs bien plus faibles peuvent être suffisantes, car, dans tous ces cas, l'acidité gastrique est réduite, ce qui permet aux salmonelles de franchir l'estomac plus facilement et en plus grand nombre.

Des toxi-infections causées par l'ingestion de très faibles doses de *Salmonella* ont aussi été signalées chez des sujets présentant une activité gastrique normale. En 1974, aux États-Unis, des bonbons au chocolat ont été à l'origine d'une épidémie de gastro-entérites, or ils ne contenaient que quelques dizaines de *Salmonella* (*S. Eastbourne*) par gramme. D'autres cas semblables ont été observés: toxi-infection au Royaume-Uni avec des barres de chocolat ne contenant chacune qu'une cinquantaine de *S. Napoli* par gramme; au Canada, du cheddar renfermant une dizaine de salmonelles par gramme a été mis en cause dans une épidémie de gastro-entérites touchant près de 2 000 personnes. Deux explications ont été proposées pour rendre compte de ces phénomènes:

- la consommation de ces denrées se fait en dehors des repas, c'est-à-dire dans une période pendant laquelle elles traversent trop rapidement l'estomac pour que les germes soient détruits;
- les aliments incriminés sont riches en lipides, ceux-ci pourraient jouer un rôle protecteur vis-à-vis de l'acidité gastrique.

Les gastro-entérites à *Salmonella* donnent une symptomatologie beaucoup moins grave que les fièvres typhoïdes. L'incubation est de douze à vingt-quatre heures en moyenne, les signes cliniques principaux sont les vomissements, la fièvre, la diarrhée, les douleurs abdominales. La guérison est de règle, en général en vingt-quatre à quarante-huit heures. Cependant, chez les sujets immunodéprimés, les vieillards et les enfants, la maladie peut se compliquer par une septicémie. Ce phénomène s'observe aussi chez des sujets présentant une immunité normale, avec des souches dont le pouvoir pathogène est exceptionnellement élevé; il est alors à relier à l'acquisition d'un plasmide.

• **Épidémiologie des TIAC à *Salmonella***

– **Incidence**

En France, les salmonelloses ont représenté en moyenne 64 % des foyers de toxi-infections alimentaires recensées entre 1995 et 2005.

Les cas de décès observés concernent en général des personnes âgées placées en institution. Le nombre de cas de salmonelloses répertoriés est plus élevé en restauration collective (64 %) qu'en restauration familiale (35 %), contrairement au nombre de foyers.

Années	Tous types	Nombre de foyers par type					
		Infections collectives	Foyers familiaux	Épidémies hospitalières	Colonies de vacances	Ecole	Crèche
2002	332	81	238	8	2	2	1
2001	391	54	319	5	1	7	5
2000	460	83	358	8	2	5	5

Tableau 1 – Répartition des foyers par type en 2000, 2001 et 2002

(Source: CNR des *Salmonella* - Unité de Biodiversité des Bactéries Pathogènes Emergentes – Institut Pasteur)

– **Réservoir**

La plupart des animaux peuvent héberger des *Salmonella* au niveau de leur intestin: mammifères domestiques ou sauvages, reptiles, batraciens, oiseaux. Certains sont classiquement sujets à un simple portage intestinal asymptomatique: porcs, volailles. D'autres, comme les bovins, font une entérite. Le résultat est l'élimination des *Salmonella* dans le milieu naturel.

– **Transmission**

Le mode d'élevage actuel qui tend à créer de fortes concentrations animales favorise la transmission de germes.

– **Contamination**

La contamination des aliments est directement ou indirectement liée à un contact avec les excréments d'animaux ou à un milieu souillé par ces matières. L'origine animale des contaminations a été bien mise en évidence quand on a montré que la fréquence de certains sérovars augmentait parallèlement dans les populations animales et chez l'homme, avec un léger décalage dans le temps. C'est ainsi que l'on observe une évolution cyclique avec des poussées et des déclinés de sérovars successifs tandis que d'autres sont permanents dans la pathologie (*Typhimurium*, *Enteritidis*). La contamination peut être aussi le fait de porteurs sains humains: 5 % de la population hébergent des *Salmonella* dans les voies biliaires et les éliminent dans leurs matières fécales. Elle est paucimicrobienne, seule une multiplication des *Salmonella* dans l'aliment peut être à l'origine d'une diarrhée aiguë. Cette multiplication se produit à l'occasion de fautes commises sur la chaîne alimentaire, en général une rupture de la chaîne du froid. Ainsi, un œuf infecté fraîchement pondu ne renferme qu'une dizaine de *Salmonella*; en deux jours à température ambiante, elles se sont multipliées et atteignent 10¹¹ par gramme.

Les aliments incriminés sont majoritairement les œufs et ovoproduits, mais aussi les viandes, les volailles, le lait, le poisson, les huîtres et autres mollusques marins, rarement les produits végétaux. La viande hachée insuffisamment cuite est également à l'origine d'infections. La contamination des viandes a lieu, lors de l'abattage, à partir du contenu intestinal. Cette contamination est généralement sans incidence pour la viande quand elle n'est pas hachée, car la cuisson l'élimine facilement. Par contre, dans le cas de la viande hachée, la contamination est redistribuée au centre de la matière première et une cuisson insuffisante risque donc de ne pas l'éliminer.

La répartition mensuelle des foyers montre une prédominance estivale et automnale.

Animaux (AN)		Hygiène alimentaire (HA)				Environnement (EV)					
Sérovars	Nbre	Sérovars	Nbre	Sérovars	Nbre	Sérovars	Nbre	Sérovars	Nbre		
Typhimurium	1669	Senftenberg	91	Typhimurium	1773	Brandenburg	165	Enteritidis	675	Saintpaul	103
Enteritidis	737	Mbandaka	89	Enteritidis	801	London	148	Virchow	606	Braenderup	84
Virchow	527	Panama	88	Virchow	691	Anatum	138	Typhimurium	602	Panama	83
Newport	210	Dublin	73	Derby	576	Panama	138	Muenster	273	Bredeney	81
Saintpaul	202	Kottbus	73	Newport	492	Braenderup	102	Heidelberg	237	Hadar	78
Derby	191	Give	69	Infantis	360	Mbandaka	94	Senftenberg	188	Mbandaka	66
Heidelberg	181	Hadar	69	Bredeney	359	Tennessee	94	Newport	187	Meleagridis	58
Indiana	171	Muenster	58	Saintpaul	359	Hadar	89	Infantis	163	Ohio	48
Infantis	141	Regent	55	Indiana	327	Give	75	Anatum	140	Regent	46
Bredeney	140	Bovismorbificans	46	Montevideo	207	Livingstone	70	Indiana	138	Brandenburg	38
Montevideo	133	Schwarzengrund	42	Heidelberg	184	Ohio	69	Tennessee	131	Derby	34
Agona	109	Brandenburg	41	Muenster	174	Havana	57	Montevideo	107	Schwarzengrund	33
Anatum	104			Agona	170			Agona	105		
Total		5 309		Total		7 712		Total		4 304	
Nb. total de souches inventoriées		5 948		Nb. total de souches inventoriées		8 794		Nb. total de souches inventoriées		4 832	

Tableau 2 – Principaux sérovars classés selon l'origine des souches (CNEVA Paris)

<i>Salmonella enterica</i>	N souches	n sérotypes
15 principaux sérotypes (sous-espèce enterica) (voir liste cidessous)	10 170 (86,4 %)	15
Autres sérotypes de la sous-espèce enterica	1356	196
Variants monophasiques ou immobiles de la sous-espèce enterica	155	
Autres sous-espèces (salamae, arizonae, diarizonae, houtenae)	53	20
Souches auto-agglutinables ("rough")	41	
Nombre total de <i>Salmonella</i> d'origine humaine enregistrées au CNR en 2002	11 775	232

Répartition des 15 premiers sérotypes de <i>Salmonella</i> isolés chez l'Homme en France en 2002 et 2001					
Rang	Sérotype	2002		Différence 2002-2001	Rang 2001
		N	%		
1	Enteritidis	4469	37,9	-430	1
2	Typhimurium	3998	33,9	225	2
3	Hadar	282	2,4	-427	3
4	Infantis	178	1,5	-65	4
5	Virchow	174	1,5	-53	5
6	Derby	162	1,4	19	9
7	Typhi	154	1,3	-3	8
8	Brandenburg	142	1,2	13	10
9	Heidelberg	126	1,1	-31	7
10	Newport	99	0,8	-78	6
11	Dublin	92	0,8	18	12
12	Paratyphi B	85	0,7	11	13
13	Bovismorbificans	77	0,6	13	14
14	Panama	75	0,6	19	19
15	Blockley	57	0,5	23	24

15 sérotypes : 10 170 souches (86,4 %) en 2002 vs. 10 979 (87,1 %) en 2001

Années	Nombre de foyers par sérotype		
	Tous sérotypes	Enteritidis	Typhimurium
2002	332	167	98
2001	391	211	93
2000	460	250	113

Tableau 3 – Répartition des foyers par sérotype en 2000, 2001 et 2002

(Source : CNR des *Salmonella* - Unité de Biodiversité des Bactéries Pathogènes Emergentes – Institut Pasteur)

2.1.2.2. *Shigella*

Il s'agit d'un autre groupe d'entérobactéries dont l'incidence est moindre que celle des *Salmonella*. Elles sont immobiles, ne possèdent ni uréase, ni tryptophane-désaminase, ni lysine-décarboxylase et ne donnent pas de sulfure d'hydrogène.

Les *Shigella* sont responsables d'un syndrome dysentérique : fièvre élevée, début brusque, diarrhées liquides, purulentes et sanglantes avec douleurs abdominales (la dysenterie bacillaire est différente de la dysenterie amibienne que nous évoquerons dans le chapitre V. Les quatre espèces de *Shigella* sont entéropathogènes. Il y a environ 10 000 cas de shigelloses en France chaque année mais assez peu sont d'origine alimentaire. Ces cas sont dus, pour la plupart, à *Shigella dysenteriae* et à *Shigella flexneri*. Ils surviennent dans les collectivités où existent des problèmes d'hygiène et au cours d'épidémies familiales.

Dans les pays en voie de développement, les cas à *Shigella sonnei* et *Shigella boydii* sont les plus fréquents.

2.1.2.3. *Escherichia coli* entérohémorragiques

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques appartiennent au groupe des STEC (Shiga-toxin-producing *E. coli*) car ils produisent des Shiga-toxines : les toxines Stx1, neutralisables par des anticorps anti-Shiga-toxine de *Shigella dysenteriae* 1, ou les toxines Stx2 non neutralisables. Ils sont responsables de colites hémorragiques (diarrhée aqueuse puis sanglante, avec crampes abdominales) dans 90 % des cas et d'un syndrome hémolytique et urémique (SHU) dans 10 % des cas. Ce syndrome se manifeste par une anémie hémolytique, une insuffisance rénale aiguë ; on l'observe principalement chez les enfants de 6 mois à 5 ans.

Ils ont été découverts en 1982 aux États-Unis, à l'occasion de deux épidémies de colites hémorragiques sévères reliées la consommation de hamburgers insuffisamment cuits dans une chaîne de restauration rapide. Une souche d'*Escherichia coli* d'un sérotype nouveau (O 157:H7) a été identifiée dans les selles des malades et dans la viande de bœuf avec laquelle les hamburgers avaient été confectionnés. Peu de temps après, ce même sérotype fut isolé des selles d'enfants atteints par un syndrome hémolytique et urémique (SHU).

Depuis cette date, plusieurs épidémies importantes consécutives à la consommation d'aliments contaminés par des STEC ont été observées : à Washington en 1993 (consommation de hamburgers avec 501 malades, 45 SHU et 3 décès), au Japon en 1996 (radis blanc : 9451 malades et 12 décès), et en Écosse en 1996 (viande de bœuf : 137 malades et 10 décès). Toutes ces épidémies étaient dues au sérotype O157 : H7.

En France, deux toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ont été décrites : l'une due à *E. coli* O157 en décembre 2000 (10 cas), l'autre à un STEC non O157 (O148:H8) en juin 2002, incriminant de la viande de mouton. Des cas isolés sont également sans doute à relier aux STEC. Les aliments suspectés sont les produits d'origine animale ayant été consommés crus ou peu cuits comme des produits à base de lait cru, de vache ou de chèvre (2 foyers de cas groupés en 1993 et 1994), bœuf, mouton.

2.1.2.4. *Campylobacter*

Longtemps considérés comme d'intérêt exclusivement vétérinaire, les bactéries du genre *Campylobacter* sont de plus en plus fréquemment mises en cause dans les diarrhées aiguës. Le premier isolement dans des selles humaines a été publié en Belgique en 1972. Ce n'est qu'en 1977, après un travail de Skirrow, que l'on prit vraiment conscience de l'importance de ces bactéries en pathologie humaine. Depuis cette date, le nombre des travaux augmente de façon exponentielle... Les *Campylobacter* thermophiles constituent certainement une cause d'entérite aussi importante que les *Salmonella*. Dans les pays développés qui en font la recherche, ils arrivent en première et deuxième position parmi les bactéries entéropathogènes. En Grande-Bretagne, plus de 24 000 cas furent recensés en 1985 contre 12 000 pour les *Salmonella*. Des résultats semblables ont été obtenus aux États-Unis. Sur vingt et un pays disposant d'un réseau de surveillance, douze trouvent *Campylobacter* plus fréquent que les autres bactéries entéropathogènes.

• Position taxonomique

Leur forme incurvée, leur mobilité par ciliation polaire, expliquent que ces micro-organismes furent classés, dans un premier temps, avec les vibriens. En fait, ils diffèrent des vibriens par des caractères métaboliques (leur métabolisme n'est pas fermentatif, ils sont micro-aérophiles) et par leur G + C % qui est compris entre 29 et 35 %. C'est pourquoi Sebald et Veron proposèrent en 1963 de les classer dans un genre nouveau : *Campylobacter*, inclus dans la famille des *Spirillaceae*. La position taxonomique des *Campylobacter a*, depuis, à nouveau évolué : ils sont aujourd'hui inclus dans le groupe des « bacilles à Gram-, aérobies ou micro-aérophiles,

mobiles, de forme hélicoïdale, vibrioïde », au sein de la famille des *Campylobacteriaceae*.

Il existe quinze espèces ou sous-espèces reconnues dont huit ont été isolées de prélèvements humains.

• Symptomatologie des infections à *Campylobacter jejuni* et *C. coli*

Deux espèces interviennent dans les TIA: *C. jejuni* et *C. coli* (*C. jejuni* prédomine, il est responsable de 99 % des campylobactérioses).

Les *Campylobacter* peuvent exercer leur action pathogène tout au long du tube digestif, notamment au niveau du jéjunum et du côlon. Ils provoquent essentiellement des entérites. Après une période d'incubation de un à trois jours, surviennent la fièvre, la diarrhée, des douleurs abdominales avec parfois du sang dans les selles et des vomissements. Le tableau clinique ressemble donc à celui des *Salmonella* ou des *Shigella*, mais la gravité est souvent moindre. La fièvre est en général moins élevée. Leur physiopathologie est mal connue. On sait qu'ils sont particulièrement bien adaptés à la vie dans le mucus et agissent principalement par leur pouvoir d'invasion. La dose infectante est faible, elle a été estimée à quelques centaines de bactéries.

Le passage dans le sang est possible (mais exceptionnel) lorsqu'il n'est pas contrarié par l'immunité (fréquente chez l'adulte). Dans ce cas, la bactériémie ne persiste que dans des cas d'immunodéficience, du fait de la sensibilité de ces espèces au pouvoir bactéricide du sérum.

• Épidémiologie

– Le réservoir

On trouve *C. jejuni*:

- presque constamment dans le tractus digestif des oiseaux, tant la volaille (poulet, dinde) que les oiseaux sauvages ;
- fréquemment dans les selles d'animaux d'élevage (bovins et caprins) et de compagnie (chiens, chats).

Le réservoir de *C. coli* est constitué principalement par l'intestin du porc, accessoirement celui des moutons, des vaches ou des oiseaux. La contamination est d'origine alimentaire.

– Les aliments mis en cause

Ce sont essentiellement les viandes et les volailles. Au cours du processus d'abattage, les carcasses sont superficiellement contaminées, lors de l'éviscération, par des *Campylobacter* d'origine intestinale. Ceux-ci survivent à + 4 °C mais ne se multiplient pas dans l'aliment, contrairement aux autres bactéries entéropathogènes. Ils résistent mal à l'exposition à l'air et à la dessiccation. Une cuisson insuffisante (type barbecue) d'une viande fortement contaminée peut être à l'origine de campylobactérioses. D'autres aliments peuvent faire l'objet de contaminations croisées lors de leur préparation dans la cuisine.

Le rôle prédominant de la viande de volaille a pu être affirmé par la concordance fréquente entre les sérotypes trouvés chez l'homme et ceux isolés à partir de ce type de viande.

Le lait cru est une cause de petites épidémies survenant sur le mode familial ou dans les collectivités. La contamination du lait peut provenir d'une souillure fécale lors de la traite ou d'une mammite à *Campylobacter*.

2.1.2.5. *Yersinia enterocolitica*

• Position taxonomique

Cette espèce est classée parmi les entérobactéries. On l'identifie assez facilement par l'aspect de ses colonies sur les milieux ordinaires (les *Yersinia* donnent de petites colonies), la possession à la fois d'une ONPG hydrolase et d'une uréase très active. Le problème est, ensuite, de différencier cette espèce de *Yersinia pseudotuberculosis* (responsable de symptômes voisins mais dont l'origine alimentaire n'est pas classique) puis d'établir qu'il s'agit d'un des sérotypes entéropathogènes (en France, principalement O₃ et O₄).

• Symptomatologie

Les yersiniose surviennent par petites épidémies ou de façon sporadique : chez l'enfant ce sont essentiellement des gastro-entérites fébriles et chez l'adulte des septicémies, des adénites, des polyarthrites. L'incubation est en moyenne de 24 à 48 heures.

Les formes entéritiques ou entérocolitiques.

Elles sont dominées par la diarrhée (2/3 des cas), liquide ou pâteuse, parfois glaireuse ou purulente, rarement sanguinolente mais toujours malodorante. Le nombre de selles émises par jour varie de quelques unes à une quinzaine ou plus (réhydratation alors nécessaire). L'abdomen est sensible. Les autres symptômes sont inconstants : douleurs abdominales diffuses, vomissements, nausées, atteinte de l'état général, forte fièvre 39-40 °C pendant quelques jours puis vers 38 °C durant plusieurs semaines, maux de tête.

Les douleurs de la fosse iliaque droite ou abdominale.

Elles sont fréquemment accompagnées d'une adénite mésentérique et de diarrhée.

• Épidémiologie

– Les aliments mis en cause

Ce sont essentiellement :

- les viandes, principalement le porc, mais aussi bœuf et agneau ;
- les produits laitiers (plusieurs milliers d'infections aux États-Unis en 1981 et 1982 avec du lait pasteurisé, 239 malades à New York en 1981 avec du lait en poudre, crèmes glacées, boissons au lait chocolaté...);
- les moules, les huîtres ;
- certaines préparations culinaires et surtout crudités.

– Origine et transfert des contaminants

Le porc (notamment la viande hachée) est un véritable réservoir de souches pathogènes de *Y. enterocolitica*, dont il est porteur au niveau de la cavité pharyngée. Les langues de porc ainsi que la viande hachée (bœuf ou porc) sont très souvent contaminées par des souches de sérotypes O:3 et moins souvent O:9. Les volailles sont également des porteurs digestifs sains, ce qui peut entraîner la contamination des œufs en surface.

Le sol et l'eau sont des sources importantes de souches non adaptées. La contamination de crudités (carottes râpées, salades, légumes crus) est généralement d'origine tellurique, elle peut, cependant être liée à la manipulation simultanée de denrées contaminées (contamination croisée).

Les yersinioses connaissent un pic de novembre à mars, puisque l'hiver du fait de la multiplication préférentielle du germe entre +4 °C et +10 °C. Ce caractère psychrotrophe de *Yersinia enterocolitica* explique que les yersinioses soient souvent le fait d'aliments qui aient été conservés longtemps au réfrigérateur. En fait, alors que de nombreuses toxi-infections alimentaires étaient connues depuis très longtemps, l'incidence des yersinioses n'est vraiment devenue significative que depuis le développement domestique des pratiques de réfrigération.

2.2. Micro-organismes agissant par la sécrétion d'une entérotoxine

2.2.1. Mécanisme d'action des entérotoxines : exemple de la toxine cholérique

Le mécanisme des diarrhées aiguës d'origine entérotoxique peut être décomposé en plusieurs temps (nous décrivons ici l'exemple de la toxine cholérique).

- 1 – Les bactéries adhèrent à la muqueuse. Cette adhésion fait intervenir les fimbriae des germes (pili) et des récepteurs spécifiques de l'entérocyte.
- 2 – L'adhésion à la muqueuse provoque la libération de la toxine qui se fixe par sa sous-unité B sur un récepteur spécifique de nature gangliosidique.
- 3 – La fixation de la sous-unité B crée les conditions de la pénétration de la sous-unité A dans l'entérocyte.
- 4 – La sous-unité A exerce son action en stimulant la sécrétion de l'eau et de sels minéraux.

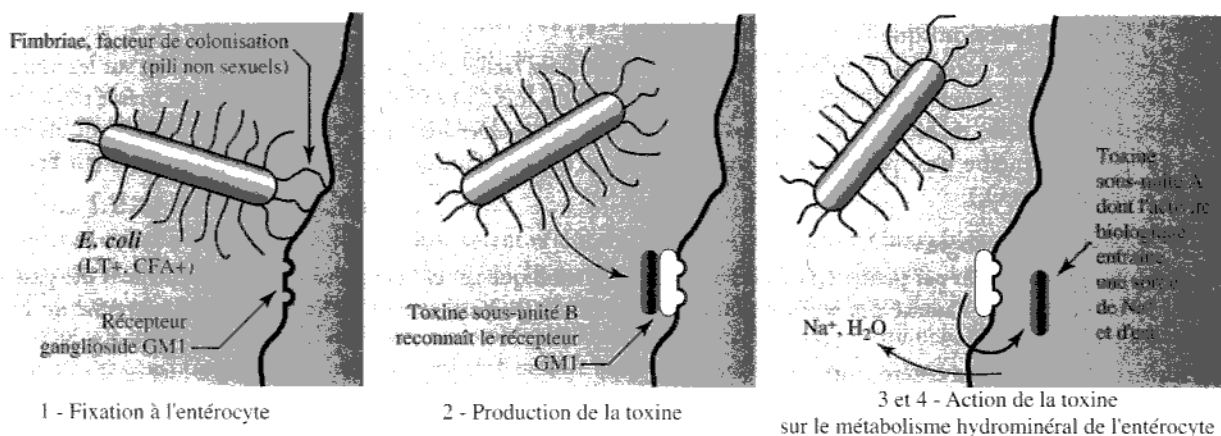


Fig. 5 – Mécanisme d'action des entérotoxines

La toxine cholérique et celle des ETEC agissent en adénosylant la protéine G α : la stimulation de l'adénylate cyclase devient permanente. Il s'ensuit une forte concentration en AMP cyclique, la phosphorylation des canaux au chlore par la Kinase A, elle-même activée par l'AMP cyclique. La fermeture des canaux chlorure explique une rétention en chlorure et en eau ainsi que la diarrhée

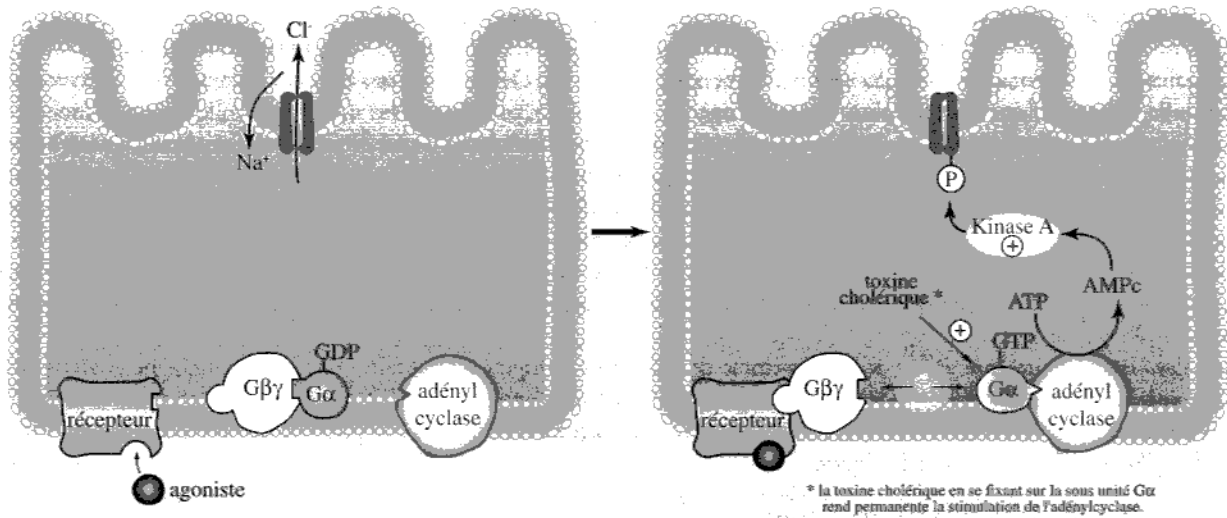


Fig. 6 – Mécanisme d'action des entérotoxines cholériques

Les selles des diarrhées entérotoxiques sont donc dépourvues de leucocytes, de sang ou de glaire: il n'y a pas de réaction inflammatoire.

On a pu mettre en évidence la sécrétion d'une entérotoxine présentant les mêmes propriétés et un mécanisme d'action comparable chez *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* et quelques autres espèces d'importance secondaire dans les toxi-infections alimentaires: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*.

2.2.2. Principales bactéries responsables d'intoxications alimentaires agissant par sécrétion d'une entérotoxine

2.2.2.1. *Clostridium perfringens*

• Position taxonomique – Principaux caractères

Les *Clostridium* sont de gros bacilles à Gram+, anaérobies stricts, sporulés.

Au sein de ce groupe, *Clostridium perfringens* est l'espèce la plus fréquemment mise en cause dans des intoxications alimentaires. Son aptitude à sporuler lui confère une grande thermorésistance. Sa température optimale de croissance est de 45 °C, ce qui peut expliquer sa persistance au sein d'un morceau de viande après la cuisson et sa capacité à s'y multiplier dans la zone profonde (le refroidissement y est plus lent) dans les heures qui suivent la cuisson.

Il tolère jusqu'à 5 % d'oxygène. La présence de sang protège *C. perfringens* de l'action toxique de l'oxygène, probablement du fait de l'activité de la catalase sanguine qui détruit les peroxydes responsables de cette action toxique. C'est pourquoi, ses capacités de multiplication dans un produit carné sont supérieures à celles constatées pour d'autres aliments.

• Symptomatologie et physiopathologie

Clostridium perfringens sécrète plusieurs toxines antigéniquement différentes et qui permettent de distinguer cinq types: A, B, C, D, E.

Certaines souches de *Clostridium perfringens* A produisent aussi une entérotoxine constituée de deux sous-unités: l'une hydrophile, l'autre hydrophobe. La distinction est importante, car seules ces souches sont susceptibles de provoquer des intoxications alimentaires. La mise en évidence de *C. perfringens* dans les selles est en effet banale: cette bactérie fait partie de la flore intestinale normale.

Un syndrome diarrhéique ne peut être relié à l'action pathogène de *Clostridium perfringens* que s'il est démontré que celui-ci appartient au type A et qu'il est sécréteur d'une entérotoxine.

La sécrétion de l'entérotoxine est liée à la sporulation du germe. Lorsqu'un aliment contenant de grandes quantités de formes végétatives est ingéré, ces dernières sporulent dans l'intestin et l'entérotoxine est libérée. Elle se fixe sur la bordure en brosse des entérocytes par sa partie hydrophile, la partie hydrophobe passe à l'intérieur de la cellule et y exerce ses effets biologiques. La toxine provoque des lésions superficielles de l'épithélium (ce qui explique une diminution de la réabsorption de l'eau), stimule la sécrétion d'eau et de chlorure de sodium. Les deux effets se conjuguent pour donner la diarrhée.

Les symptômes apparaissent 8 à 12 heures après l'ingestion des aliments contaminés, il s'agit du temps nécessaire à la sporulation et à la production de l'entérotoxine.

Les deux signes cliniques les plus constants sont la diarrhée profuse et les douleurs abdominales. Il n'y a en général ni vomissement ni fièvre. La maladie régresse en 24 à 48 heures sans séquelles.

• **Épidémiologie**

Clostridium perfringens est une bactérie ubiquitaire, présente dans le sol mais aussi dans la flore intestinale de l'homme et des animaux. Les contaminations des aliments sont donc fréquentes. Des formes végétatives peuvent aussi se trouver dans la viande à la suite d'une bactériémie avant l'abattage.

Les intoxications alimentaires dues à *C. perfringens* sont presque toujours, pour les raisons que nous avons indiquées, dues à l'ingestion de viandes cuites à l'eau. La température de la zone centrale de celles-ci n'est en général pas suffisante pour détruire les spores formées par le germe. Cette zone refroidissant plus lentement que la périphérie, la température se maintient assez longtemps dans les limites favorisant la prolifération de la bactérie.

Des concentrations élevées (10^6 - 10^8) sont nécessaires pour déclencher un processus pathologique.

Clostridium perfringens représente la quatrième cause de TIA dans les pays industrialisés, après *Salmonella*, *Campylobacter* et *Staphylococcus aureus*.

Aux Pays-Bas, il représente un quart de l'ensemble des accidents d'origine alimentaire. En Grande-Bretagne et aux États-Unis, son incidence est aussi considérable.

L'examen des statistiques françaises (document 1) montre que notre pays ne fait pas exception, même si l'incidence des TIAC à *Clostridium perfringens* tend à diminuer.

2.2.2.2. *Staphylococcus aureus*

• **Position taxonomique**

Les staphylocoques sont des coques :

- à Gram+ ;
- possédant une catalase ;
- ayant un métabolisme fermentatif.

La classification actuelle distingue une vingtaine d'espèces. Seuls les staphylocoques coagulase+ sont considérés comme potentiellement pathogènes. Trois espèces peuvent coaguler le plasma de lapin oxalaté : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* et *Staphylococcus hyicus*. L'espèce *aureus* est, elle-même, scindée en plusieurs biotypes selon l'origine animale de la souche.

• **Épidémiologie**

Parmi les staphylocoques coagulase+, seules les souches productrices d'entérotoxine sont impliquées dans une intoxication alimentaire.

Staphylococcus intermedius peut sécréter une entérotoxine ainsi que, plus irrégulièrement, *Staphylococcus hyicus*, mais celle-ci est peu abondante et peu active. D'autre part, la contamination d'un aliment par ces deux espèces est peu probable.

Ces données expliquent que seule l'espèce *aureus* est impliquée dans des TIA (au sens large).

Les travaux de M.L. de Buyser ont montré, en 1985, que la proportion de staphylocoques entérotoxiques est variable selon le biotype : 30 % à 60 % du biotype humain, 10 % des souches du biotype bovin, 80 % des souches du biotype ovin.

C'est le biotype humain qui joue le rôle essentiel dans les TIA à staphylocoques, certainement du fait du portage de *Staphylococcus aureus* relativement fréquent (30 % à 50 %) dans la gorge et les fosses nasales.

La contamination de l'aliment peut être originelle (lait de mammites) et concerne alors des biotypes animaux, mais elle résulte en général de la manipulation d'aliments par les porteurs sains ou par des personnes atteintes d'une rhinopharyngite à staphylocoques ou de lésions cutanées (pus : furoncle, anthrax...).

Les aliments en cause sont des produits cuits contaminés après la cuisson : viandes, poissons, tranches de charcuterie, plats

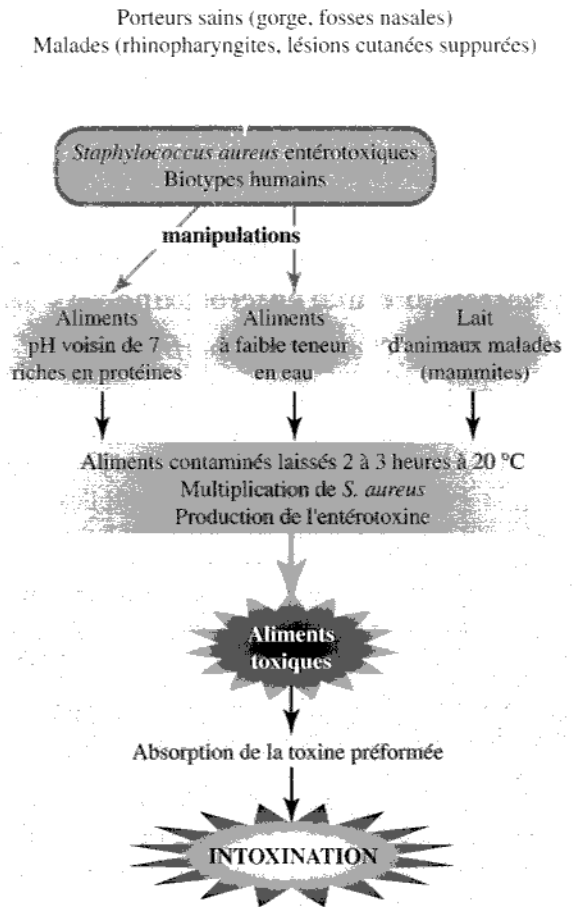


Fig. 7 – Mécanisme de l'intoxication à *S. aureus*

cuisinés divers, crèmes glacées et pâtisseries, ou des aliments à faible Aw : salaisons, laits concentrés, laits en poudre. L'aliment ne devient toxique qu'après la multiplication des staphylocoques : des concentrations en bactéries de l'ordre de 10^6 à 10^{10} doivent être réalisées, ce qui suppose le maintien de l'aliment trois à quatre heures à la température ambiante.

• Physiopathologie et symptomatologie

Les entérotoxines staphylococciques sont différentes des autres entérotoxines. Elles sont constituées d'une seule chaîne d'acides aminés ; elles ne provoquent aucune lésion de l'épithélium intestinal.

Les entérotoxines A à E, G, et I à U ont une activité dite « superantigène ». Elles sont capables de provoquer une activation polyclonale des lymphocytes T. Pour cela, elles se fixent directement aux cellules présentatrices d'antigènes, par deux liaisons au niveau de l'antigène de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH II) en dehors du site de fixation classique des antigènes. Les superantigènes sont alors reconnus par les lymphocytes T. Cette reconnaissance se fait par une liaison de la chaîne V β du récepteur lymphocytaire TCR2 des cellules CD4+ ou CD8+ (fixation sur les régions constantes de certains types de chaîne V β). Cette fixation sur la chaîne V β est alors suffisante pour induire une activation cellulaire. Ainsi, 5 à 50 % des lymphocytes T sont concernés et sont activés indépendamment de leur spécificité antigénique, ouvrant la possibilité d'une activation massive du système immunitaire, la libération de cytokines de l'inflammation et la survenue du choc toxique.

L'entérotoxine de *Staphylococcus aureus* est produite dans l'aliment en phase exponentielle de la croissance des germes. On ingère la toxine avec l'aliment contaminé, elle exerce directement ses effets biologiques sur ses récepteurs. C'est une intoxication.

La symptomatologie est brutale : après une période d'incubation courte, en moyenne de deux à quatre heures, apparaissent, de façon brusque et violente, des céphalées, des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements violents incoercibles et répétés (c'est le signe le plus caractéristique), de la diarrhée. Il n'y a pas de fièvre. C'est une maladie courte mais éprouvante. Les malades ont la sensation de mourir, la guérison est pourtant de règle dans les 24 heures bien que persiste pendant quelques jours une certaine fatigue.

2.2.2.3. *Bacillus cereus* (voir document 3 - Extraits du BEH n° 33/93)

• Description

Bacillus cereus est un bacille à Gram+, sporulé, aérobic, possédant une catalase et une lécithinase, dépourvu d'oxydase. Il se cultive bien sur les milieux ordinaires. Sa température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37 °C. Les températures extrêmes de croissance sont, respectivement, de l'ordre de 5 et de 55 °C. Sa croissance est inhibée par l'acide sorbique.

• Physiopathologie et symptomatologie

Bacillus cereus sécrète, pendant la phase exponentielle de sa croissance, l'une des deux toxines suivantes :

- soit une toxine émétique thermostable, responsable de vomissements ;
- soit une toxine diarrhéigène thermolabile.

Il existe des souches émétiques et des souches diarrhéigènes, les deux types pouvant coexister dans un même aliment.

Une intoxication à *Bacillus cereus* peut donc se manifester de deux façons :

- un syndrome émétique avec nausées, vomissements qui surviennent une demi-heure à six heures après l'ingestion de l'aliment et sont comparables à ceux provoqués par les staphylocoques entérotoxiques, violents et incoercibles ;
- un syndrome diarrhéique avec apparition, après six à quinze heures d'incubation, de diarrhée aqueuse et de crampes abdominales sans fièvre.

La guérison est rapide (24 heures).

• Épidémiologie

Les intoxications à *Bacillus cereus* eurent une incidence élevée par le passé. Elle est nettement moindre de nos jours sous nos climats. Elles restent assez fréquentes dans certains pays : Danemark, Italie, Suède.

Bacillus cereus est un germe tellurique. On le retrouve aussi, en petite quantité, dans la flore intestinale. Les spores sont véhiculées par les poussières.

Le riz préparé dans les restaurants orientaux est le principal aliment responsable des formes émétiques. En effet, *Bacillus cereus* se développe bien dans les aliments riches en polysaccharides. Il contamine le riz après sa cuisson et se multiplie lorsque l'aliment est laissé plusieurs heures à la température ambiante. Les traitements thermiques ultérieurs sélectionnent la toxine émétique qui est thermostable.

La toxine diarrhéigène a pu être mise en évidence dans des aliments plus variés : purée de pommes de terre, saucisses, plats cuisinés...

10^4 à 10^5 bactéries/gramme sont nécessaires pour déclencher l'intoxication.

2.2.2.4. Autres bactéries entérotoxiques

• *Vibrio cholerae* O₁

Il est responsable d'épidémies de choléra qui restent une des premières causes de mortalité dans le monde. Les cas en Europe du Nord sont rares. La contamination est généralement hydrique, les contaminations d'origine alimentaire sont rares. Il n'entre pas vraiment dans la catégorie des TIA telle que nous l'avons définie et que nous l'abordons. Nous le citons ici pour mémoire. Des épidémies dues à des souches de *Vibrio cholerae* non O₁ ont été signalées, en particulier au Bangladesh.

• *Vibrio parahaemolyticus*

C'est une bactérie bien adaptée à l'eau de mer, présente dans les eaux côtières et d'estuaire. Elle ne peut s'y multiplier qu'à une température supérieure à 15 °C, c'est-à-dire en période estivale sous nos climats. Son taux de croissance est très élevé : la population double toutes les dix minutes. Ce germe est très sensible à la chaleur, il est détruit au-delà de 48 °C. Il ne supporte pas non plus les basses températures et la réfrigération est suffisante pour l'éliminer.

Les coquillages ainsi que divers fruits de mer qui filtrent des quantités importantes d'eau de mer peuvent héberger *Vibrio parahaemolyticus*. Notons que seuls ces organismes consommés crus, sans réfrigération préalable, peuvent être dangereux. Cela élimine les poissons conservés au froid et consommés crus. Le crabe, les crevettes dont la cuisson est très courte, mais surtout les coquillages « sauvages » (coques, palourdes...) présentent un danger potentiel.

En fait, ces intoxications sont rares en France. Au Japon, elles représentent plus de la moitié des TIA recensées. Cette incidence très élevée est à relier à la consommation importante de poisson cru.

L'intoxication à *Vibrio parahaemolyticus* se manifeste par des douleurs abdominales, des vomissements et de la diarrhée. L'ingestion de plus de 10⁶ micro-organismes est nécessaire pour déclencher les troubles.

Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005

Gilles Delmas (g.delmas@invs.sante.fr)¹, Anne Gallay¹, Emanuelle Espié¹, Sylvie Haeghebaert², Nathalie Pihier³, François-Xavier Weill⁴, Henriette De Valk¹, Véronique Vaillant¹, Jean-Claude Désenclos¹

Cet article présente la synthèse des données relatives aux foyers de toxi-infections alimentaires collectives (Tiac) déclarés en France, sur la période 1996 – 2005

Durant cette période, 5 847 foyers de Tiac ont été déclarés, provoquant 80 361 malades dont 7 364 (9 %) ont été hospitalisés. Quarante-cinq décès ont été rapportés.

Soixante-quatre pour cent des Tiac sont survenues en restauration collective ou commerciale. L'agent responsable a pu être identifié dans les aliments et / ou des prélèvements d'origine humaine dans 46 % des foyers.

Salmonella a été isolée dans 84 % des foyers dont l'agent a été confirmé.

Ces foyers ont été à l'origine de 49 % du total des malades et de 61 % du total des hospitalisations. Il existe une recrudescence des foyers, estivale pour *Salmonella*, et hivernale pour les foyers d'origine virale. Les œufs ou les produits à base d'œufs crus ou peu cuits ont été responsables de 30 % des foyers de Tiac dans lesquels un aliment a pu être incriminé.

Au moins un facteur ayant contribué à l'incident a été rapporté dans 46 % des foyers. Plus de la moitié de ces facteurs ont trait à des erreurs dans la préparation ou des délais excessifs entre préparation et consommation.

Afin de mieux répondre aux objectifs de sécurité sanitaire des aliments, il importe d'augmenter la proportion de foyers notifiés pour lesquels une investigation conjointe des services de santé humaine et vétérinaire est réalisée.

Objectif

Cet article présente la synthèse des données relatives aux foyers de toxi-infections alimentaires collectives (Tiac) déclarés en France, sur une période de 10 ans, entre 1996 et 2005. Des synthèses régulières de cette surveillance ont été publiées dans le Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) [1; 2; 3; 4; 5; 6].

Modalités et qualité des systèmes de surveillance

La déclaration obligatoire (DO)

Un foyer de Tiac est défini par la survenue d'au moins deux cas groupés, d'une symptomatologie similaire, en général digestive, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

Toute Tiac doit faire l'objet d'une déclaration à la Direction départementale des affaires sanitaires et sociales (Ddass) ou à la Direction départementale des services vétérinaires (DDSV). Cette déclaration est obligatoire : « ... d'une part pour tout docteur en médecine ou biologiste qui en a constaté l'existence, d'autre part, pour le principal occupant, chef de famille ou d'établissement, des locaux où se trouvent les malades... ».

La DO permet aux Ddass et aux DDSV des départements de survenue des foyers de réaliser une enquête épidémiologique et vétérinaire destinée à confirmer une Tiac en identifiant les aliments responsables et les facteurs ayant éventuellement favorisé la survenue de la Tiac, comme les défauts d'hygiène, ou les ruptures de chaîne de froid ou de chaud, afin de prendre des mesures spécifiques pour contrôler l'épisode et prévenir les récurrences [7]. Dans certaines situations, notamment pour les Tiac dépassant le cadre

du département, la Cellule interrégionale d'épidémiologie (Cire) et/ou l'Institut de veille sanitaire (InVS) peuvent apporter leur soutien à l'investigation.

Depuis 2003, un signalement en temps réel à l'InVS précède la DO, dès que l'événement est connu. L'analyse et la synthèse des données sont réalisées par l'InVS après mise en commun des DO reçues par l'InVS et les rapports d'enquête reçus par la Direction générale de l'alimentation (DGAH) [8].

Les Centres nationaux de référence (CNR)

Douze CNR contribuent à la surveillance épidémiologique des agents à transmission alimentaire. (*Salmonella*, bactéries anaérobies et botulisme, *Campylobacter* et *Helicobacter*, virus entériques, *Escherichia coli* et *Shigella*, *Listeria*, *Trichinella*, staphylocoques, *Brucella*, *Francisella tularensis*, hépatites A et E, toxoplasmose).

CNR des *Salmonella*

La surveillance des salmonelles réalisées par le CNR s'appuie sur un réseau volontaire de 1 400 laboratoires hospitaliers et d'analyses biologiques médicales privés qui envoient leurs souches de *Salmonella* pour sérotypage ou des fiches d'information documentant les souches sérotypées par les laboratoires. La notion d'isolement dans un contexte de cas groupés est précisée aussi bien pour les souches envoyées que pour les fiches d'information.

Autres CNR

Le CNR des *Campylobacter* a mis en place un système similaire à celui du CNR des *Salmonella*. Une base de données commune est en cours d'installation entre l'InVS et le CNR des virus entériques afin d'améliorer la qualité et

(1) Institut de veille sanitaire, Saint-Maurice, France

(2) Institut de veille sanitaire, Lille, France

(3) Direction générale de l'alimentation, Paris, France

(4) Centre national de référence des salmonelles, Paris, France

la circulation des informations recueillies sur les Tiac liées à ces virus.

Les autres CNR ont essentiellement un rôle d'expertise et assurent la confirmation de l'identification ou le typage des souches ou des toxines dans les prélèvements cliniques en cas de Tiac.

Microbiologie alimentaire

La recherche de germes pathogènes dans les aliments, lorsque des plats témoins (en restauration collective) ou des restes ont été conservés, est assurée au niveau départemental par les laboratoires vétérinaires départementaux.

Exhaustivité des systèmes de surveillance

L'exhaustivité de la DO des Tiac à salmonelles a été estimée par capture-recapture en 2000 à 26 % [IC95 % : 22-31] et celle du CNR des *Salmonella* à 41 % [IC95 % : 36-49] [3] [10]. Compte-tenu du fait que les infections à salmonelles ont une symptomatologie marquée, donnant fréquemment lieu à une consultation médicale, il est probable que les Tiac liées à cet agent soient mieux diagnostiquées et mieux déclarées (elles représentent 60 % de l'ensemble des Tiac déclarées (tableau 1)) que les Tiac liées à des agents responsables de symptomatologies moins sévères comme *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ou les virus entériques.

Investigations réalisées

Soixante pour cent des foyers ont fait l'objet d'un rapport d'investigation. Cette proportion était de 68 % en restauration collective ou commerciale, et de 46 % pour les foyers familiaux. Dans les 2 cas, la tendance montre une diminution de la proportion des événements investigués, de 84 en 1996 à 53 % en 2005 en restauration collective et commerciale, et de 52 % à 33 % pour les Tiac en milieu familial.

Principales caractéristiques épidémiologiques

Évolution du nombre de Tiac

Au total, 5 847 foyers de Tiac, ont été déclarés pour la période 1996 à 2005. Après une augmentation du nombre de Tiac déclarées jusqu'en 1998, on a observé une tendance à la stabilisation (figure 1).

Répartition géographique

Tous les départements français ont déclaré au moins 1 foyer entre 1996 et 2005 (figure 2). Quinze départements en ont déclaré plus de 100, parmi lesquels 4 en ont déclaré plus de 150; quatre départements ont déclaré moins de 10 foyers sur ces 10 années.

Sources de déclaration

Entre 1996 et 2005, 48 % des déclarations de Tiac ont été faites par un médecin (généraliste ou un hospitalier), 14 % par un responsable d'établissement, 13 % par les Ddass, 19 % par un déclarant autre, parmi lesquels 34 % émanaient de malades eux-mêmes, 10 % d'un autre service (DDSV, Direction départementale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DDCCRF), Services communaux d'hygiène et de santé

Tableau 1. Nombre de foyers de Tiac, de cas, d'hospitalisations et de décès selon l'agent étiologique confirmé ou suspecté entre 1996 et 2005.

Agent	Foyers		Cas		Hospitalisations		Décès	
	N	% ^a	N	% ^a	N	% ^a	N	% ^b
Agents confirmés								
<i>Salmonella</i>	1 713	64,2 %	16 230	48,8 %	2 961	61,0 %	21	0,13 %
dont Enteritidis	936	54,6 %	9 152	56,4 %	1 759	10,8 %	13	0,14 %
Typhimurium	312	18,2 %	2 976	18,3 %	500	3,1 %	5	0,17 %
Autres sérotypes ^c	132	7,7 %	1 999	12,3 %	312	1,9 %	2	0,10 %
Sérotypes indéterminés	333	19,4 %	2 103	13,0 %	390	2,4 %	1	0,05 %
<i>Clostridium perfringens</i>	136	5,1 %	5 375	16,2 %	42	0,1 %	2	0,04 %
<i>Shigella</i>	42	1,6 %	337	1,0 %	58	0,2 %	0	-
<i>Campylobacter</i>	37	1,4 %	426	1,3 %	55	-	1	0,23 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	366	13,7 %	5 750	17,3 %	1182	3,6 %	2	0,03 %
<i>Bacillus cereus</i>	94	3,5 %	1 766	5,3 %	148	0,4 %	4	0,23 %
Histamine	89	3,3 %	777	2,3 %	148	0,4 %	0	-
Virus	38	1,4 %	950	2,9 %	3	0,0 %	0	-
Autres pathogènes ^d	152	5,7 %	1 622	4,9 %	258	0,8 %	2	0,12 %
Total agents confirmés	2 667	45,6 %	33 233	100,0 %	4 856	14,6 %	32	0,10 %
Agents suspectés								
<i>Salmonella</i>	261	12,6 %	3 558	11,4 %	316	1,0 %	1	0,03 %
<i>Clostridium perfringens</i>	383	18,5 %	8 956	28,8 %	65	0,2 %	3	0,03 %
<i>Shigella</i>	3	0,1 %	20	0,1 %	1	0,0 %	0	-
<i>Campylobacter</i>	10	0,5 %	250	0,8 %	15	0,0 %	0	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	744	35,9 %	8 926	28,7 %	812	2,6 %	0	-
<i>Bacillus cereus</i>	196	9,5 %	3 532	11,4 %	225	0,7 %	0	-
Histamine	143	6,9 %	926	3,0 %	162	0,5 %	1	0,11 %
Virus	191	9,2 %	3 759	12,1 %	47	0,2 %	0	-
Autres pathogènes ^e	143	6,9 %	1 166	3,8 %	102	0,3 %	2	0,17 %
Total agents suspectés	2 074	35,5 %	31 093	38,7 %	1 745	5,6 %	7	0,02 %
Total agents indéterminés	1 106	18,9 %	16 025	19,9 %	763	2,5 %	6	0,04 %
Total foyers	5 847	100,0 %	80 351	100,0 %	7 364	100,0 %	45	100,0 %

(a) Pour les différents agents, % par rapport au total des agents confirmés ou suspectés. Pour les sérotypes de *Salmonella*, % par rapport au total des *Salmonella*.

(b) Nombre de décès pour 100 malades pour chaque germe.

(c) S. Hadar (21 foyers) - S. Heidelberg (19 foyers) - S. Virchow (19 foyers) - S. Newport (10 foyers) - Autres sérotypes (63 foyers).

(d) *E. Coli* (44 foyers) - *C. Botulinum* (22 foyers) - Coliformes (18 foyers) - *V. Parahaemolyticus* (12 foyers) - DSP (20 foyers) - Toxique (6 foyers) - VTEC O 157 (4 foyers) - VTEC O 148 (1 foyer) - *Streptococcus* (2 foyers) - *Trichinella* (4 foyers) - *Brucella* (1 foyer) - Levures (1 foyer) - Toxopt. (1 foyer) - VHA (1 foyer) - *Yersinia enterocolitica* (1 foyer) - Autre (14 foyers).

(e) *E. Coli* (46 foyers) - *Ciguatera* (39 foyers) - Agent allergisant (10 foyers) - DSP (20 foyers) - *C. botulinum* (5 foyers) - Toxique (5 foyers) - *V. Parahaemolyticus* (2 foyers) - Champignons (1 foyer) - Levures (1 foyer) - Autre (14 foyers).

(SCHS...), et 5 % d'un centre anti-poisons. L'origine de la déclaration n'a pas été précisée pour 5 % des D.O.

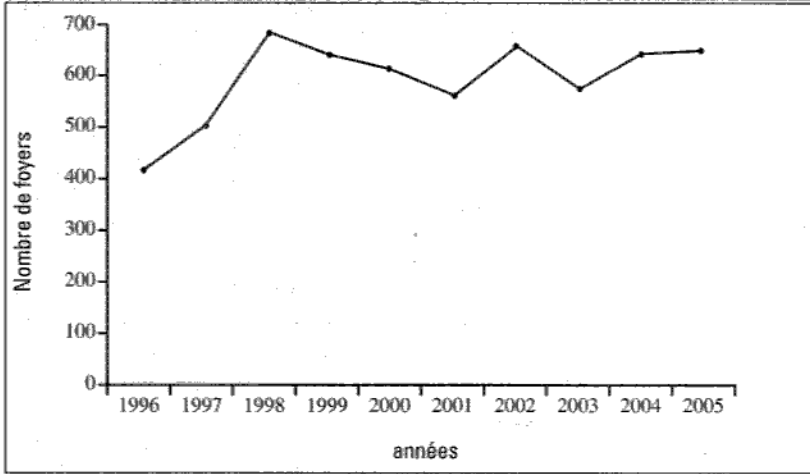
Les Tiac déclarées aux Ddass sont saisies à l'InVS dans une base de données, celles déclarées aux DDSV sont saisies à la DGAI, qui transmet annuellement cette base à l'InVS, où ces deux bases sont fusionnées, et les doublons en sont éliminés.

Agents responsables

L'agent responsable des Tiac a été mis en évidence microbiologiquement dans 2 667 foyers (46 %). Il a été suspecté sur des critères cliniques et épidémiologiques dans 2 074 foyers (35 %). (tableau 1).

Parmi les foyers dont l'agent a été confirmé biologiquement, celui-ci a été identifié dans l'aliment exclusivement pour 693 foyers (27 % des foyers à agent confirmé), dans un prélèvement d'origine humaine exclusivement pour 1 379 foyers (55 %) ; il a été mis en évidence dans l'aliment et un prélèvement d'origine humaine dans 435 foyers (17 %). Parmi les foyers pour lesquels l'agent était confirmé, *Salmonella* était le plus fréquemment isolée (64 %) et le sérotype Enteritidis était prédominant (54 % des Tiac à *Salmonella*) (tableau 1). Le nombre de foyers dus aux autres agents confirmés était stable au fil du temps (figure 3).

Figure 1. Évolution du nombre de foyers de Tiac déclarés en France entre 1996 et 2005, toutes étiologies confondues.



La proportion de foyers pour lesquels aucun agent pathogène n'a été détecté ni n'a pu être suspecté était élevée (19 %). Elle était assez stable durant la période 1996 – 2005 (entre 10 et 25 %)

Gravité des cas

Les 5 847 foyers de Tiac déclarés entre 1996 et 2005 ont provoqué 80 351 malades dont 7 364 (9 %) ont dû être hospitalisés. Quarante-cinq personnes sont décédées (0,06 % des malades). L'agent incriminé dans ces décès était *Salmonella* pour 22 personnes (49 % des décès), *Clostridium Perfringens* pour cinq personnes (11 %), *Bacillus Cereus* pour 4 personnes (9 %), *Staphylococcus Aureus* pour deux personnes (4 %), *E-coli* pour quatre personnes (9 %), *Campylobacter* pour une personne, histamine pour une personne. L'agent responsable n'a pu être mis en évidence pour six décès (13 %) (tableau 1).

Répartition mensuelle des foyers

Il existe une recrudescence des foyers de Tiac, particulièrement des foyers à *Salmonella* durant la période estivale (juin à septembre). Les Tiac pour lesquelles une origine virale a été confirmée ou suspectée sont survenues plus fréquemment durant la période hivernale (novembre à mars). Le nombre de foyers liés à d'autres agents (*B. cereus*, *C. perfringens*, *S. aureus*) ainsi que le nombre de foyers pour lesquels l'agent responsable n'a pas été identifié est stable tout au long de l'année (figure 4).

Lieu de survenue

Soixante-quatre pour cent des Tiac sont survenues en restauration collective ou commerciale et 35 % en milieu familial. Les Tiac en restauration collective ou commerciale ont été à l'origine de 82 % des malades, dont 40 % en milieu scolaire (887/3 757 foyers collectifs), 18 % en restauration commerciale (1 354/3 757), 11 % dans des institutions médico-sociales (381/3 757), 10 % en restauration d'entreprise (320/3 757), et 21 % dans des autres collectivités (815/3 757).

Le nombre médian de malades par foyer était de quatre [2 ; 300] en milieu familial et de neuf en restauration collective ou commerciale [2 ; 440].

La proportion de Tiac à salmonelles était plus élevée en milieu familial qu'en restauration collective ou commerciale (respectivement 57 % et 21 %) ; elle était en moyenne de 31 % en restauration commerciale, avec une diminution au fil des années, de 40 % en 1996 à 20 % en 2005.

Aliment identifié ou suspecté

Un aliment a pu être incriminé dans 1 255 foyers (21 %), et suspecté dans 3 005 foyers (51 %).

Aucun aliment n'a pu être incriminé ni suspecté dans 1 587 foyers (28 %) (tableau 2). La responsabilité d'œufs et de préparations à base d'œufs crus ou peu cuits a été établie dans 59 % des foyers de Tiac à salmonelles ; l'origine des œufs était précisée dans 50 % des cas, parmi lesquels 42 % provenaient de centres d'emballage et 45 % de productions familiales.

Les produits laitiers et les plats ayant nécessité des manipulations étaient plus fréquemment retrouvés pour les Tiac à *S. aureus* [9] et les plats en sauce pour *C. perfringens* et *B. cereus*. Des coquillages ont été incriminés dans 32 % des Tiac où des virus entériques ont été détectés ou suspectés.

Trente-trois des 58 foyers où des boissons ont été incriminées étaient attribués à de l'eau de distribution.

Facteurs ayant contribué à la survenue de la Tiac

Parmi les 2 687 foyers (46 %) pour lesquels au moins un facteur ayant contribué à l'incident a été rapporté, 1 603 (60 %) étaient liés à une erreur dans la préparation ou un délai excessif entre la préparation et la consommation. Le non-respect des températures (chaînes du chaud ou du froid) de conservation des aliments (46 %), l'équipement en cuisine inadéquat (40 %), l'utilisation de matières premières contaminées (35 %) et les erreurs dans le processus de préparation (32 %) ont constitué les principaux facteurs favorisants identifiés.

Conclusions

Entre 1996 et 2005, 5 847 foyers de Tiac ont été déclarés en France, impliquant 80 351 malades, 7 364 hospitalisations et 45 décès.

Salmonella a été à l'origine de 64 % des foyers pour lesquels un agent étiologique a été confirmé ; *S. Enteritidis* étant le sérotype prédominant ; 22 % de ces foyers ont été attribués à la consommation d'œufs ou de produits à base d'œufs.

Soixante-quatre pour cent des foyers sont survenus en restauration collective ou commerciale. La persistance de l'utilisation d'œufs frais en restauration collective, notamment en restauration scolaire et dans des institutions médico-sociales, a continué d'être à l'origine de Tiac à salmonelles dont les conséquences peuvent être graves.

En effet en 2001, deux personnes âgées sont décédées suite à une Tiac à *Salmonella* Enteritidis, liée à la consommation d'un dessert à base d'œufs crus, survenue dans une maison de retraite. L'un des plus importants foyer recensé a causé plus de 250 cas de salmonellose en 2001 chez des jeunes enfants suite à la consommation d'une préparation à base de mayonnaise, faite avec des œufs frais, servie dans des cantines scolaires d'un département du sud-ouest.

Figure 3. Évolution du nombre de foyers dus aux principaux agents responsables confirmés, Tiac déclarées en France de 1996 à 2005

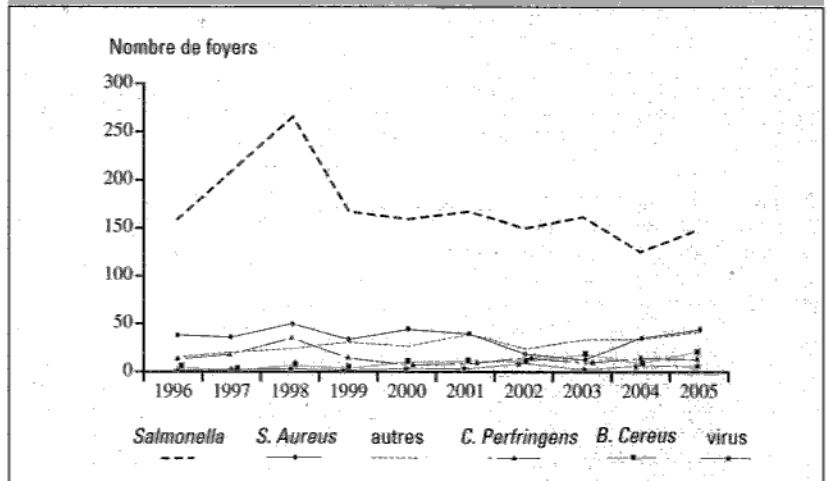
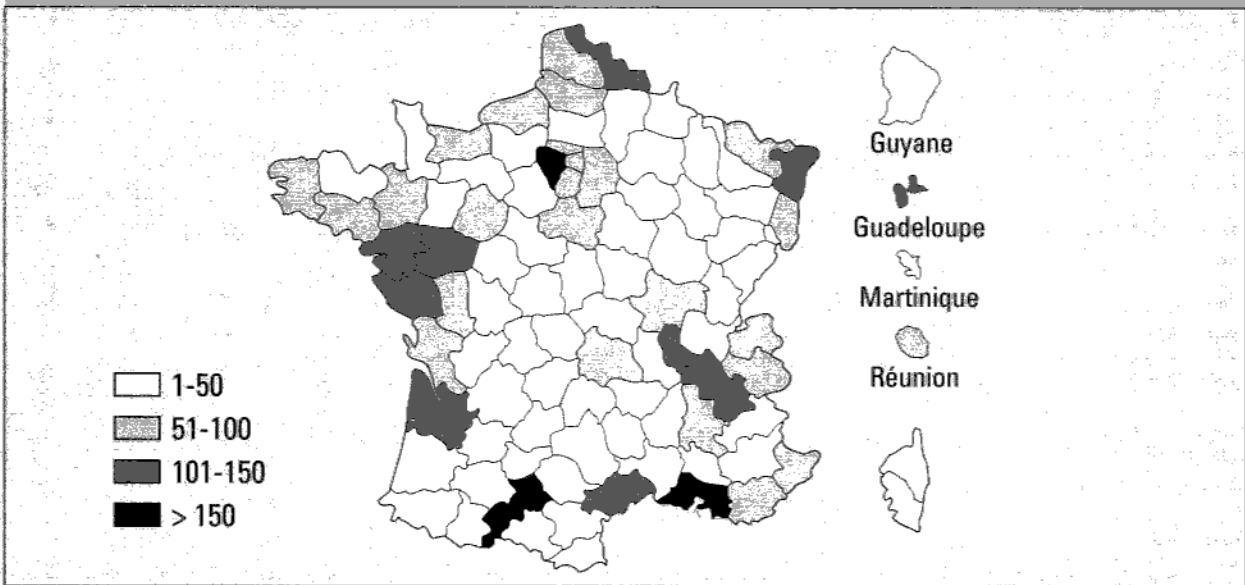


Figure 2. Distribution départementale du nombre de foyers de Tiac déclarés en France entre 1996 et 2005.



Recommandations

La déclaration des Tiac doit continuer à être stimulée afin d'améliorer son exhaustivité et un effort doit être particulièrement réalisé pour la déclaration et l'investigation des Tiac familiales.

La coordination des différents acteurs de la surveillance doit être favorisée, et renforcée au besoin.

Il convient d'insister sur les points suivants : la déclaration des foyers de Tiac au Ddass ou aux DDSV doit être précoce de façon à permettre une investigation rapide ; - plus de la moitié (54 %) des foyers en milieu familial et 32 % des foyers en restauration collective ou commerciale n'ont pas fait l'objet d'investigations.

Ces investigations par les Ddass et les DDSV doivent être réactives, coordonnées et plus systématiques ; les protocoles de fonctionnement entre ces services doivent favoriser

l'échange de données au moyen du logiciel Win-Tiac permettant une optimisation du processus de signalement, d'investigation et de standardisation des rapports afin que le dispositif de surveillance des Tiac en France réponde aux objectifs de surveillance de la sécurité sanitaire des aliments.

Il convient d'améliorer le diagnostic étiologique des Tiac en encourageant la prescription de coprocultures lors de la survenue de Tiac et en incluant la recherche de pathogènes non recherchés en routine comme les *Campylobacter*, les *E. coli entérohémorragiques* (EHEC), les virus entériques, lorsque la clinique oriente vers ce type d'agent (par exemple, la recherche d'EHEC en présence de diarrhées sanglantes). Le logiciel WinTiac incluant un algorithme d'orientation étiologique, il permet de réduire la proportion des Tiac pour lesquelles aucun germe n'a pu être suspecté.

Les efforts d'application des bonnes pratiques d'hygiène en restauration doivent être poursuivis et renforcés notamment dans les institutions médico-sociales, en restauration commerciale et scolaire où le nombre de foyers de Tiac, en particulier à salmonelles, à *Clostridium perfringens* et à *Bacillus cereus* reste élevé.

Les Tiac survenant en milieu familial, où les salmonelles sont prédominantes pourraient être prévenues par l'application de recommandations d'hygiène simples, relatives en particulier à la conservation des œufs [11]. Les informations à destination des personnes les plus vulnérables (personnes âgées, malades, jeunes enfants), relatives aux risques liés à la consommation d'œufs crus ou peu cuits ainsi qu'à la nécessité de consommer les viandes hachées et volailles cuites « à cœur » devrait être renforcée.

Figure 4. Répartition mensuelle des foyers de Tiac déclarés en France entre 1996 et 2005 pour les principaux agents responsables confirmés ou suspectés

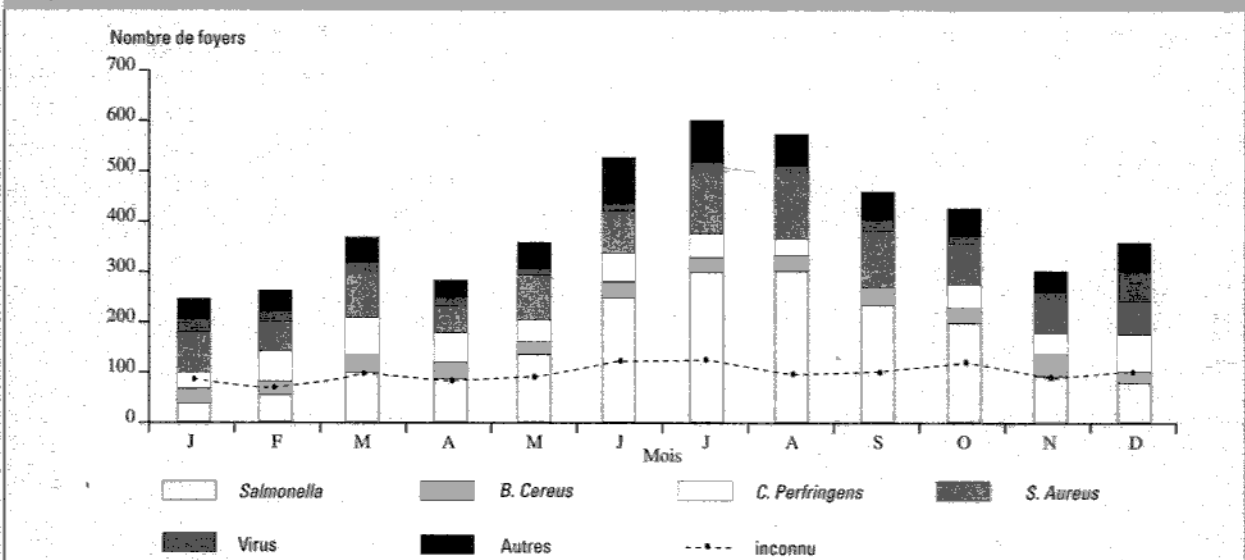


Tableau 2. Agents identifiés ou suspectés et aliments responsables ou suspectés. Tiac déclarées aux Ddass ou DDSV, France, 1996-2005

Aliments	Salmonella				Clostridium prefringens	Staphylococcus aureus	Virus	Autres agents	Agents indéterminés	Total
	Enteritidis	Typhimurium	Autres Sérotype	sérotypes inconnus						
Laits et produits laitiers	7	6	11	8	11	181	1	24	18	267
Œufs et préparations à base d'œufs	704	138	24	239	29	96	2	10	44	1 286
Vielandes	19	40	10	45	172	108	2	38	55	489
Produits de charcuterie	18	37	16	25	26	74	2	44	37	279
Volailles	21	12	37	45	73	63	4	33	28	318
Poissons et crustacés	12	3	4	19	39	53	9	269	38	446
Coquillages	13	6	2	10	8	10	104	63	34	250
Autres aliments	52	20	10	66	296	263	11	61	90	869
Eau de boisson	0	0	0	2	2	11	6	10	27	58
Aliments non retrouvés	99	59	18	117	143	251	88	77	735	1 587
Total	945	321	132	576	799	1 110	229	629	1 106	5 847

Références

[1] P JM Bouvet, PAD Grimont. Données de surveillance 1998 du Centre National de Référence des *Salmonella* et *Shigella*. Bull Epidemiol Hébd 2001; 12:49-51.

[2] S. Haeghebaert, F. Le Querrec, V. Vaillant, E. Delarocque-Astagneau, P. Bouvet. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1997. BEH 1998; 41:177-181.

[3] S. Haeghebaert, F. Le Querrec, V. Vaillant, E. Delarocque-Astagneau, P. Bouvet. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1998. Bull Epidemiol Hébd 2001; 15:65-70.

[4] S. Haeghebaert, F. Le Querrec, A. Gailly, P. Bouvet, M. Gomez, V. Vaillant. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1999-2000. BEH 2002; 23:105-9.

[5] S. Haeghebaert, F. Le Querrec, P. Bouvet, A. Gailly, E. Esplé, V. Vaillant. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001. Bull Epidemiol Hébd 2002; 50:249-53.

[6] G. Delmas, F. Le Querrec, F-X. Weill, A. Gailly, E. Esplé, S. Haeghebaert, V. Vaillant. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001-2003. Surveillance nationale des maladies infectieuses, 2001-2003: <http://www.invs.sante.fr/publications/2005/snm/pdf/tiac.pdf>.

[7] Tiac: déclaration, investigation, conduite à tenir. Journal officiel de la République française n° 1487. Juin, 1988.

[8] Institut de veille sanitaire: Mortalité et morbidité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France. Rapport, 2004. http://www.invs.sante.fr/publications/2004/inf_origine_alimentaire.

[9] Marie-Laure De Buyser, Anne Brisabois, Emmanuelle Esplé, Gilles Delmas, Barbara Dufour. Implication du lait et des produits laitiers dans les maladies infectieuses d'origine alimentaire en France de 1988 à 2003. Bulletin épidémiologique de l'AFSSA, 2005; 16:1-2.

[10] A. Gailly, V. Vaillant, P. Bouvet, PAD Grimont, JC Desenclos. How many foodborne outbreaks of *Salmonella* infection occurred in France in 1995? Am J Epidemiol 2000; 152(2): 171-77.

[11] E. Delarocque-Astagneau, J.C. Desenclos, P. Bouvet, P.A.O. Grimont. Risk factors for the occurrence of sporadic *Salmonella enterica* serotype enteritidis infections in children in France: a national case-control study. Epidemiol Infect 1998; 121:561-7.

Viande hachée de bœuf et Salmonellose humaine : Épidémie de salmonellose à *Salmonella enterica* sérotype Coeln. France, Novembre 1998

S. Haeghebaert¹, V. Vaillant¹, H. Portal², P. Bouvet³, JC Minet⁴, F. Grimont⁵

ALERTE

Le 02/12/98, le Réseau National de Santé Publique (RNSP) était informé par le Centre National de Référence des *Salmonella* et *Shigella* (CNRSS) d'une augmentation, durant la première quinzaine du mois de novembre, du nombre des isollements humains de *Salmonella* Coeln reçus pour sérotypage. Le nombre de cas observé (N=26) pour ce mois, dépassait nettement le nombre observé en novembre 1997 (N=3).

Vingt et une souches provenaient de départements du quart sud-ouest de la France. Deux épidémies familiales avaient été signalées lors de l'envoi des souchés au CNR, par deux laboratoires situés dans les départements des Pyrénées Orientales et de Charente-Maritime.

Une enquête épidémiologique a été initiée afin de confirmer la nature épidémique du problème, d'en mesurer l'importance, d'identifier le véhicule et la source de l'épidémie et d'orienter les mesures de contrôle.

MATERIEL ET METHODE

Un cas a été défini comme une personne résidant dans un département du quart sud-ouest de la France, chez qui une souche de *Salmonella* Coeln avait été isolée entre le 1er et le 15 novembre 1998, à l'occasion d'un épisode infectieux aigu (gastro-entérite, septicémie). Les cas ont été identifiés par le CNRSS.

L'enquête exploratoire a porté sur les cas symptomatiques résidant dans les départements du quart sud-ouest de la France, joignables pendant les 2 jours de l'enquête. Des données cliniques et alimentaires ont été recueillies, par téléphone, à l'aide d'un questionnaire standardisé. Le questionnaire alimentaire était ciblé sur la consommation de volaille, de produits à base d'œufs et de viande bovine, en fonction des données du Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires (CNEVA) concernant ce sérotype. L'interrogatoire portait sur la consommation alimentaire des 3 jours précédant l'apparition des symptômes ou, à défaut, sur les habitudes alimentaires des quinze jours précédant l'apparition des symptômes.

Secondairement, une enquête cas-témoins a été réalisée afin de tester l'hypothèse générée par l'enquête exploratoire. Deux témoins, appariés aux cas sur le lieu de résidence, et la classe d'âge (>5 ans, 6-14 ans, >15 ans), ont été recherchés pour chaque cas. Les cas inclus dans l'enquête cas-témoins étaient ceux interrogés lors de l'enquête alimentaire exploratoire.

Les profils de 11 souches humaines de *Salmonella* Coeln, isolées pendant la période épidémique, ont été étudiés par la méthode ERIC-PCR au Centre National du Typage Moléculaire Entérique (CNRTME).

Le 4 décembre, la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) a demandé à 10 Directions des Services Vétérinaires (DSV) du quart sud-ouest de transmettre en urgence les informations concernant les TIAC à salmonelles récemment notifiées et les isollements récents de *Salmonella* Coeln d'origine alimentaire, réalisés dans les laboratoires vétérinaires départementaux (LVD).

(1) Institut de Veille Sanitaire,

(2) Direction Générale de l'Alimentation,

(3) Centre National de Référence des *Salmonella* et *Shigella*,

(4) Direction des Services Vétérinaires du Tarn et Garonne,

(5) Centre National de Référence du Typage Moléculaire Entérique.

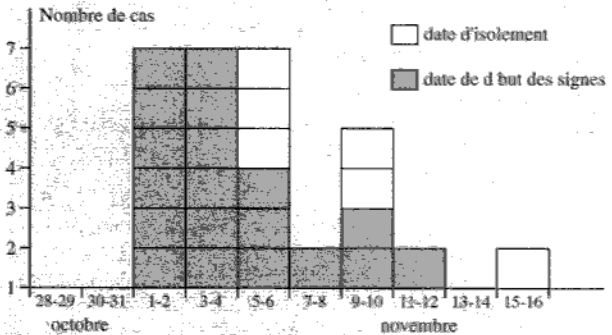
Résultats

Description de l'épidémie

Au total, 26 cas sont survenus entre le 1er et le 15 novembre 1998.

L'aspect de la courbe épidémique suggérait une source commune et ponctuelle de contamination, avec une augmentation rapide du nombre des cas, un regroupement des cas lors de la 1ère semaine du mois de novembre (1er au 6 novembre) et une diminution progressive et continue des cas durant les semaines suivantes.

Figure 1 : *Salmonella* Coeln. Distribution des cas selon la date de début des signes ou la date d'isolement. France, novembre 1998.



Quatorze départements d'un grand quart sud-ouest de la France ont été concernés par des cas. Les taux d'incidence les plus élevés (> 7 par million) ont été retrouvés dans les départements du Cantal, des Landes, des Pyrénées Orientales et de l'Ariège (figure 2). La distribution géographique des cas suggérait l'hypothèse d'une contamination par un aliment distribué largement dans le quart sud-ouest du pays.

Toutes les classes d'âge, sauf les nourrissons de moins de 1 an, étaient représentées. Deux tiers des cas étaient des enfants de moins de 15 ans.

L'épisode de salmonellose était caractérisé par une gastro-entérite fébrile, ayant donné lieu à une hospitalisation ou un recours à l'hôpital pour 15 (71 %) des 21 cas interrogés. Aucun décès, ni complication n'ont été signalés.

Enquête alimentaire

Les 15 cas interrogés dans l'enquête exploratoire avaient tous consommé, dans les trois jours précédant les signes de salmonellose, de la viande hachée de bœuf, achetée réfrigérée, conditionnée en barquette, en grande surface. Deux enseignes de distributeurs avaient été citées plusieurs fois. La fréquence de consommation de viande de bœuf hachée des cas était supérieure à celle habituellement observée pour les témoins interrogés lors d'épidémies précédentes de salmonellose ou d'enquêtes sur les cas sporadiques de salmonellose.

La TIAC familiale de Charente-Maritime était survenue à la suite d'un repas pris en commun le 31 octobre par 8 personnes, dont sept avaient été malades. Cette TIAC n'avait pas fait l'objet d'une déclaration aux autorités sanitaires du département. L'enquête de type cohorte rétrospective suggérait que l'aliment le plus probablement en cause était la sauce, insuffisamment cuite, des spaghettis bolognaises, cuisinée à base de viande de bœuf hachée et de chair à saucisse (seul aliment non consommé par la personne non malade et consommé par tous les malades).

Lors de l'enquête cas-témoins, 14 cas et 22 témoins ont été inclus. Deux témoins ont pu être trouvés pour 8 cas et 1 seul témoin pour 6 cas. La consommation de viande hachée de bœuf dans les trois jours précédant

les signes, était significativement associée au risque d'infection à *Salmonella* Coeln ($p = 0,02$). Aucun autre aliment n'était significativement positivement associé avec la maladie. Parmi les cas et les témoins ayant consommé de la viande hachée de bœuf, les cas avaient plus fréquemment acheté de la viande hachée de bœuf réfrigérée conditionnée en barquette que les témoins ($p=0,009$) (tableau 1).

Tableau 1: *Salmonella* Coeln. Fréquences de consommation et mesures d'association. France, novembre 1998.

Aliments	Cas n (%)	Témoins n (%)	OR Apparié	IC 95 %	P
Pâté	0/14 (43)	14-22 (64)	0,2	0,01-2,0	0,29
Jambon	12/14 (86)	18/21 (86)	1,1	0,1-14,1	0,76
Saucisse	5/14 (36)	13/22 (59)	0,4	0,07-2,0	0,38
Viande hachée de bœuf	14/14 (100)	12-22 (54)	incaic*	2,0-incaic	0,02
Viande hachée de cheval	3/14 (21)	1/22 (4)	4,4	0,3-236,2	0,39
Poulet	10/14 (71)	18/22 (82)	0,6	0,08-3,8	0,79
Dinde	5/14 (36)	8/20 (40)	0,8	0,2-4,2	0,90
Autres volailles	3/14 (21)	7/21 (33)	0,5	0,04-2,6	0,54
Œufs	9/14 (64)	22/22 (100)	incaic	0,0-0,6	0,02
Viande hachée de bœuf réfrigéré achetée en barquette	13/13 (100)	2/11 (18)	incaic*	5,8-incaic*	0,009

Enquête microbiologique

L'analyse par la méthode ERIC-PCR des 11 souches étudiées au CNRTME a conclu que 10 d'entre elles avaient le même profil et appartenaient à la même épidémie.

Enquête vétérinaire

L'enquête effectuée dans les lieux d'achat des cas et portant sur les fournisseurs de barquettes de steaks hachés réfrigérés a mis en évidence la présence très fréquente de l'établissement C.

Le 7 décembre, les services vétérinaires du Tarn et Garonne ont signalé à la DGAI, qu'un isolement de salmonelle non sérotypée avait été réalisé à l'occasion d'un contrôle officiel, effectué le 29 octobre, dans un atelier de fabrication de viande hachée de bœuf, situé dans ce département (établissement C). L'échantillon retrouvé positif avait été prélevé sur un lot de steaks hachés, à 5 % de matières grasses, préparés lors de la journée du 29/10. Le résultat de l'analyse avait été connu le 6 novembre. La souche de salmonelle isolée n'avait pas pu être complètement sérotypée mais sa formule antigénique partielle pouvait correspondre à celle de *Salmonella* Coeln. Un deuxième sérotypage, effectué au CNEVA Paris, a montré, le 17/12, qu'il s'agissait bien du sérotype Coeln. La liste des magasins clients de cet atelier, pour la période du 25/10 au 3/11, montrait une concordance entre la distribution géographique des cas et celle du produit incriminé par les enquêtes épidémiologiques et vétérinaires (figure 2).

Les carcasses, transformées pour la production de steaks hachés du 29/10/98, provenaient de 2 abattoirs (un principal et un accessoire). Le lot de steaks hachés du 29/10 correspondait potentiellement à une centaine d'animaux, essentiellement des vaches de réforme, provenant de nombreux élevages. Les résultats des investigations suggèrent que la contamination d'une seule carcasse pourrait avoir contaminé plusieurs mêlées successives du même lot.

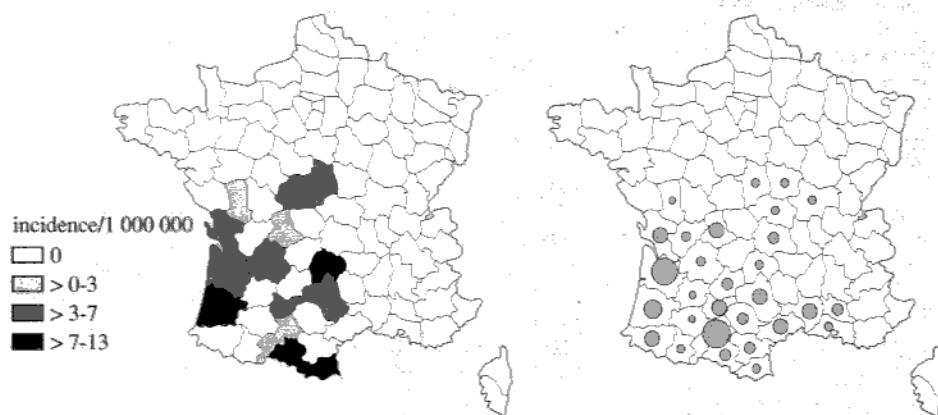


Figure 2: *Salmonella* Coeln. Taux d'incidence départementaux par million d'habitants et zone de distribution de la viande hachée produite dans l'établissement C. France, novembre 1998.

Mesures de contrôle

Dès la connaissance (06/11) des résultats du contrôle officiel, positif pour *Salmonella*, la DSV avait mis en place des mesures sur le lieu de production : désinfection des locaux et du matériel et renforcement des autocontrôles. A cette date, étant donné que la date limite de consommation (02/11) des steaks hachés du lot produit le 29/10 était dépassée, il n'a pas été jugé utile d'organiser un rappel de lots ni d'effectuer une information aux consommateurs. A la demande de la DGAI, un deuxième contrôle approfondi a été effectué, le 09/12, dans l'établissement et des mesures correctives ont été apportées : nouvelle désinfection, prélèvements sur les zones à risque aux différents stades de la chaîne de fabrication, sélection des approvisionnements en matières premières.

DISCUSSION

La surveillance des salmonelles, réalisée au CNRSS, a permis de détecter une épidémie communautaire à *Salmonella* Coeln. Le signalement, par les laboratoires au CNRSS, des cas groupés, a permis d'identifier très rapidement une TIAC, non déclarée aux autorités sanitaires. Son investigation a ainsi permis de formuler une hypothèse forte au stade initial de l'investigation et d'orienter l'enquête épidémiologique. Les résultats des différentes investigations épidémiologiques et vétérinaires montrent que cette épidémie communautaire est attribuable à la consommation de viande hachée fraîche de bœuf, provenant probablement d'un lot unique (une seule journée de fabrication), produit dans un atelier de production, situé dans le département du Tarn et Garonne.

La durée brève de l'épisode suggère que la contamination a été ponctuelle et probablement limitée à une seule journée de production (29/10), voire à une partie limitée du lot.

Cette épidémie communautaire de salmonellose, liée à la consommation de steaks hachés, est la première de ce type détectée en France. Sa détection et l'identification de l'atelier producteur ont été facilitées du fait de la rareté du sérotype en cause.

Il est probable, qu'en France, des épidémies de salmonellose liées à la consommation de ce type de produit bactériologiquement sensible ne soient pas rares, mais non détectées lorsqu'elles sont dues à des sérotypes plus fréquents comme le sérotype Typhimurium. La consommation de viande hachée de bœuf avait d'ailleurs été retrouvée comme principal facteur de risque de salmonelloses sporadiques à *Salmonella* Typhimurium dans une étude réalisée, en France en 1998, chez l'enfant de moins de 15 ans. Plusieurs épidémies communautaires de salmonellose liées à la consommation de viande de bœuf et surtout de viande hachée de bœuf ont été rapportées dans d'autres pays. Ce produit est susceptible d'être contaminé non seulement par des salmonelles mais aussi par d'autres micro-organismes responsables d'infections sévères comme les *Escherichia coli* producteurs de vérotoxine à l'origine de syndrome hémolytique et urémique.

TOXI-INFECTION ALIMENTAIRE COLLECTIVE À *BACILLUS CEREUS*

A. TALARMIN*, E. NICAND*, M. DOUCET**, C. FERMANIAN***, P. BAYLAC**** et Y. BUISSON*

Le rôle de *Bacillus cereus* dans les toxi-infections alimentaires (T.I.A.C.) est reconnu depuis 40 ans, mais il n'est identifié en moyenne que dans un seul foyer sur les 600 déclarés chaque année en France.

L'étude d'une épidémie de gastro-entérites aiguës survenue dans une école de sous-officiers de gendarmerie (E.S.O.G.) met en lumière des facteurs pouvant expliquer une sous-déclaration des T.I.A.C. à *B. cereus*.

L'ÉPIDÉMIE

Le 17 décembre 1992, 16 personnels de l'école consultent pour gastro-entérite aiguë. Au total, 43 stagiaires et cadres (34 hommes, 9 femmes) âgés de 19 à 53 ans (moyenne : 26,2 ans) sont atteints entre le 12 et le 23 décembre 1992 (fig. 1). Les principaux symptômes sont des nausées (63 %), des vomissements (60 %), une diarrhée (56 %), des douleurs abdominales (44 %), des céphalées (23 %), une fébricule (7 %). Tous les cas guérissent spontanément en moins de 24 heures, n'entraînent au total qu'une perturbation minime dans le fonctionnement de l'école.

L'ENQUÊTE ÉPIDÉMIOLOGIQUE

Cet épisode évoquant une T.I.A.C., une enquête cas-témoins est réalisée. Les cas sont définis comme tout personnel de l'école ayant présenté des troubles digestifs spontanément résolutoires entre le 10 et le 30 décembre. Les témoins sont choisis parmi les personnels présents à l'école au cours de cette période, après appariement sur l'âge et le sexe. Aucun lien significatif avec la participation aux repas précédant le pic du 17 décembre n'est mis en évidence (tabl. 1).

L'étalement de la courbe épidémique et son aspect trimodal font rechercher une contamination réitérée. Les stagiaires ayant définitivement quitté l'école à l'occasion des fêtes de fin d'année, une enquête postale rétrospective est effectuée auprès de 42 cas et 43 témoins sur les préférences dans le choix des boissons servies au self avec les repas. Elle identifie la consommation de jus d'orange comme seul facteur de risque ($p < 0,001$, OR = 8,77; IC95 : 2,9-26,6).

Au cours de cette période, aucune pathologie similaire n'est notifiée à la D.D.A.S.S. parmi la population civile.

Tableau 1. — Recherche du repas contaminant

Repas	Rationnaires			Non rationnaires			P
	Total (n)	Cas (n)	T.A. (%)	Total (n)	Cas (n)	T.A. (%)	
Dîner 15 décembre	34	10	29	17	5	29	N.S.
Déjeuner 16 décembre	50	15	30	2	1	50	N.S.
Dîner 16 décembre	40	17	42,5	16	4	25	N.S.

T.A. : taux d'attaque; N.S. : différence non significative.

L'ENQUÊTE MICROBIOLOGIQUE

Chez les malades

Des prélèvements de selles sont effectués chez 10 patients ayant présenté une symptomatologie diarrhéique. Celle-ci étant très brève, les selles recueillies sont mouillées. Les coprocultures sur milieux sélectifs et enrichis pour l'isolement de *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Clostridium parfringens*, *Staphylococcus aureus* et *B. cereus* restent négatives. La recherche de *Rotavirus* et d'*Adenovirus* est également négative.

Dans les aliments

L'analyse bactériologique des repas témoins et de l'eau de boisson conclut à leur conformité aux normes actuellement en vigueur. En revanche, on isole en culture pure *B. cereus* à partir de 2 échantillons de concentré de pulpe d'orange à raison de 100 à 200 unités formant colonies (ufc)/ml (souches n° 29155 et 29172). Ce concentré, présenté en briques de 1 litre, est utilisé au self après dilution (1 volume de pulpa d'orange pour 5 volumes d'eau) et servi en fontaines réfrigérées. *B. cereus* a été retrouvé dans toutes les briques livrées avec le même lot et examinées par la suite.

La recherche de toxine diarrhéique de *B. cereus* est effectuée par 3 techniques : cytototoxicité sur cellules McCoy en culture [3], agglutination passive réverse (BCT-RPLA®, OXOID) et test ELISA sandwich (TECRA®, 3 M). La toxinogénèse est démontrée à partir des surnagants de culture des 2 souches de *B. cereus*. De plus, la toxine diarrhéique est mise en évidence directement dans un échantillon du concentré de pulpe d'orange.

COMMENTAIRES

Les T.I.A.C. à *B. cereus* peuvent réaliser 2 tableaux cliniques différents :

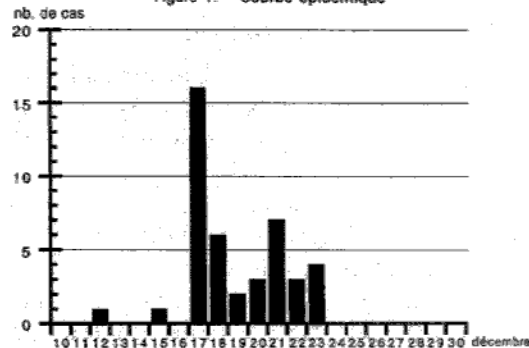
- un syndrome de gastro-entérite aiguë dominé par les douleurs abdominales et la diarrhée, lié à la production *in vivo* d'une entérotoxine thermolabile;
- des vomissements profus, survenant quelques heures après l'ingestion d'une toxine émettrice thermostable préformée dans l'aliment.

S'agit-il ici d'une toxi-infection ou d'une intoxication ? La durée d'incubation ne peut être appréciée du fait de l'étalement dans le temps de la consommation du jus de fruit contaminé; elle est en principe inférieure à 5 heures pour la toxine émettrice, de 8 à 16 heures pour la toxine diarrhéique, mais des incubations plus courtes ou plus longues ont été observées au cours de T.I.A.C. impliquant la toxine diarrhéique de *B. cereus* [4]. Ici, la symptomatologie ne permet pas de trancher avec certitude : le syndrome « émétique pur » (31 %) et le syndrome « diarrhéique pur » (26 %) étant moins fréquents que l'association des 2 (43 %), une association des 2 toxines ne peut être écartée. La fièvre, observée chez 7 % des sujets atteints, est en faveur d'un processus toxi-infectieux; décrite dans 5 à 23 % des cas, c'est une fébricule (< 37,8 °C) qui peut passer inaperçue si elle n'est pas soigneusement recherchée [4].

Les arguments microbiologiques sont l'isolement de *B. cereus* et la toxinogénèse *in vitro*. L'isolement de *B. cereus* à partir des selles de patients ne prouve pas son rôle dans l'étiologie d'une T.I.A.C. Inversement, la négativité des cultures ne l'exclut pas. La découverte de *B. cereus* dans l'aliment a beaucoup de valeur, mais elle ne constitue pas non plus une preuve absolue. Ici, la faible inoculum bactérien peut faire douter de sa responsabilité. Dans les syndromes diarrhéiques imputables à *B. cereus*, les numérations bactériennes sont généralement comprises entre 10^7 et 10^9 ufc par gramme d'aliment. *B. cereus* est une bactérie résistante à pH acide et semble pouvoir échapper à l'effet destructeur du suc gastrique tamponné par les aliments. Mais dans ce cas, la négativité des coprocultures ne s'explique pas.

Plus probable est l'hypothèse d'une absorption de toxine diarrhéique préformée dans l'aliment, attestée par l'épreuve de cytototoxicité sur cellules McCoy.

Figure 1. — Courbe épidémique



Ce mécanisme semble rarement en cause parce que la toxine thermolabile est rapidement détruite par un chauffage modéré (20 mn à 55 °C), qu'elle est instable aux pH < 4 ou > 11 et qu'elle est dénaturée par différentes enzymes telles que la trypsine [2]. Dans le concentré de jus d'orange, elle a pu conserver toute son activité malgré l'acidité (pH 3,5). La recherche de la toxine diarrhéique *in vitro* peut être effectuée par tout laboratoire mais la mise en évidence de la toxine émettrice de *B. cereus* reste beaucoup plus délicate [2].

Les aliments trouvés à l'origine des T.I.A.C. à *B. cereus* sont très variés en raison du caractère ubiquitaire de cette bactérie sporulée : viandes de boucherie, volailles, fruits de mer et différents légumes ont été incriminés. Le riz frit servi dans les restaurants asiatiques est presque toujours en cause dans les syndromes émétiques en raison d'une conservation préalable du riz cuit à l'eau à température ambiante, permettant la production de la toxine thermostable [1]. La responsabilité d'un concentré de jus de fruit du commerce n'avait, à notre connaissance, jamais été mentionnée jusqu'à présent.

CONCLUSION

Les arguments permettant d'imputer avec certitude l'étiologie d'une T.I.A.C. à *B. cereus* sont plus difficiles à réunir que pour les salmonelles. L'analyse microbiologique qualitative et quantitative des aliments suspects, l'épreuve de toxinogénèse à partir des isolats de *B. cereus* et la recherche directe des toxines dans l'aliment sont nécessaires pour étayer le diagnostic. Il est cependant indispensable que les données cliniques, épidémiologiques et microbiologiques, isolément insuffisantes, soient confrontées pour aboutir à une conclusion cohérente. Ces difficultés contribuent peut-être à une sous-déclaration des T.I.A.C. à *B. cereus*.

RÉFÉRENCES

- [1] C.D.C. — Foodborne diseases : *Bacillus cereus*. — *Relevé épidém. hebdo.*, 1986, n° 42 : 326-27.
- [2] GILBERT R., KRAMER J. — *Bacillus cereus* enterotoxins : present status. — *Biochem. Soc. Trans.*, 1984, 12 : 199-200.
- [3] JACKSON S. — Rapid screening test for enterotoxin-producing *Bacillus cereus*. — *J. Clin. Microbiol.*, 1983, 31 : 972-74.
- [4] LUBY S., JONES J., DOWDA H., KRAMER J., HORAN J. — A large outbreak of gastroenteritis caused by diarrhoeal toxin-producing *Bacillus cereus*. — *J. Infec. Dis.*, 1993, 167 : 1452-55.

* Laboratoire de biologie clinique, hôpital d'instruction des armées Val-de-Grâce, 74, boulevard de Port-Royal, 75230 Paris Cedex 05.

** E.S.O.G., Fontainebleau.

*** Centre national d'études vétérinaires et alimentaires, L.C.H.A., Paris.

**** Service central d'études et de réalisations du commissariat de l'armée de terre, Saint-Cloud.

2.3. Micro-organismes agissant par la sécrétion d'une toxine neurotrope

– Le botulisme (voir document 4 - Document de l'Institut National de veille sanitaire)

2.3.1. Position taxonomique et principaux caractères de *Clostridium botulinum*

Nous avons déjà défini les *Clostridium* comme de gros bacilles à Gram+, anaérobies stricts et sporulés. Parmi les *Clostridium*, toutes les souches responsables du botulisme ont été regroupées dans une même espèce, *Clostridium botulinum*. Cette espèce, définie par son pouvoir pathogène, est très hétérogène. M. Sebald considère que « *C. botulinum* correspond davantage à un consortium d'espèces qu'à une espèce taxonomiquement définie ». Ces bactéries sécrètent une neurotoxine parmi les plus actives que l'on connaisse.

Il y a sept neurotoxines immunologiquement différentes correspondant à sept types de *C. botulinum*: A, B, C, D, E, F, G. Ces sept types ont des caractères biochimiques sensiblement différents. Par ailleurs, en fonction de ses caractères biochimiques, *C. botulinum* est classé en quatre groupes: I, II, III et IV. La croissance de *C. botulinum* n'est pas possible à des pH < 4,5. Elle est inhibée par le chlorure de sodium, les nitrates, les nitrites.

2.3.2. Épidémiologie

C. botulinum est un germe tellurique qui, à partir de la terre ou des sédiments marins, peut passer dans l'intestin d'animaux, contaminer les poissons (type E) ou les légumes.

Le type A prédomine sur la côte Est des États-Unis, le type B en Europe et sur la côte Ouest de l'Amérique du Nord, les types C et D sont plus fréquents en Afrique et dans les pays de l'Europe du Nord, le type E, transmis en général par les produits de la mer, est le plus fréquent en ex-URSS et au Japon. Les cas de botulisme concernent aujourd'hui les conserves artisanales ou familiales insuffisamment stérilisées, les jambons crus (60 % des cas en France) et les poissons fumés.

2.3.3. Physiopathologie

• Le développement de la bactérie dans les aliments

Le développement de *Clostridium botulinum* dans les aliments dépend de conditions de milieu bien précises:

- un potentiel d'oxydoréduction peu élevé; cette condition est réalisée dans les conserves et, en profondeur, dans un jambon;
- un pH supérieur à 4,5;
- une température supérieure à + 10 °C (+ 3 °C pour le type E) et inférieure à 48 °C.

Dans les conserves mal stérilisées, les spores survivent et germent pour donner des formes végétatives viables du fait des conditions d'anaérobiose existantes.

Dans le cas des jambons, *C. botulinum* est presque toujours d'origine intestinale. Si le porc est abattu sans jeûne préalable, des germes intestinaux peuvent se trouver dans le sang du fait d'une bactériémie post-prandiale fréquente chez cet animal. Un abattage mal conduit aboutit, d'autre part, à la production de viandes à pH élevé et à faible teneur en oxygène, ou exsudatives et retenant mal le sel. *C. botulinum* se retrouvera donc viable au cœur du muscle et s'y développera du fait de conditions d'anaérobiose et de pH favorables ainsi que de la faible teneur en sel et en nitrites (destinés à inhiber sa croissance). Il y produira sa toxine.

• Les toxines botuliques et leur mode d'action

Les toxines botuliques sont produites en association avec des polypeptides non toxiques qui jouent peut-être un rôle protecteur dans le tube digestif contre l'action des acides et des enzymes protéolytiques. Elles passent dans le sang et gagnent par cette voie leurs récepteurs au niveau des jonctions neuromusculaires.

Les toxines botuliques présentent deux chaînes reliées par des ponts disulfure. La chaîne lourde B comprend les domaines qui assurent la liaison au récepteur.

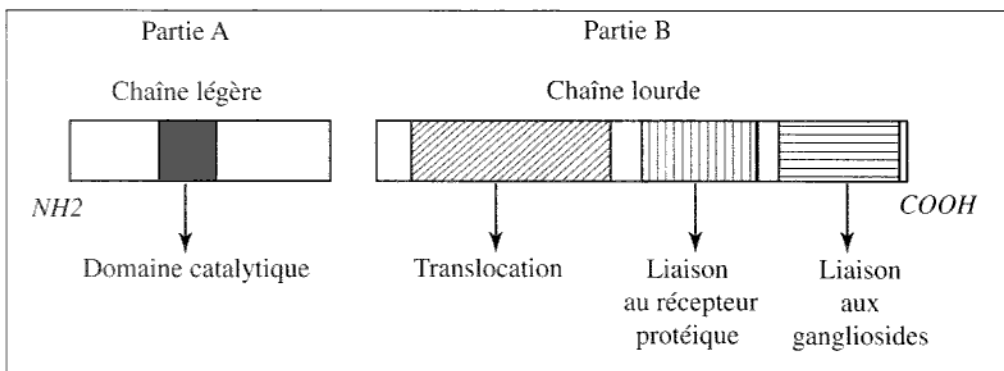


Fig. 8 – La toxine botulique

Les toxines sont produites pendant la phase exponentielle de croissance et libérées en phase stationnaire. Leur activité est très élevée : un millilitre de culture contient 10^6 DMM (dose minimale mortelle pour la souris) pour les types A, B, C ou D et 10^4 pour les types E, F et G.

Les toxines botuliques en clivant les protéines permettant l'arrimage des vésicules d'endocytose à la membrane ont indirectement pour effet d'inhiber la libération d'acétylcholine. ①

En l'absence de toxine botulique, l'arrivée du potentiel d'action dans les terminaisons présynaptiques provoque l'entrée d'ions calcium qui eux-mêmes permettent aux vésicules d'endocytose arrivées à la membrane cytoplasmique de fusionner avec cette dernière et de libérer l'acétylcholine dans la fente synaptique (fig. 8). ②

Les neurotoxines botuliques sont des métalloprotéases à zinc, c'est-à-dire des enzymes capables de couper des protéines. Leurs cibles intraneuronales sont trois protéines impliquées dans l'exocytose du contenu des vésicules synaptiques en réponse à une entrée de calcium dans le neurone. Ces protéines sont la VAMP/syntaxine, la SNAP25 et la syntaxine, les trois sont impliquées dans la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane des neurones (fig. 10)

Le mécanisme d'action des toxines botuliniques peut donc être présenté en trois étapes :

- 1 – fixation sur la membrane synaptique par sa partie B ;
- 2 – translocation de la partie A à l'intérieur de la terminaison présynaptique ;
- 3 – Inhibition de l'arrimage à la membrane présynaptique des vésicules d'endocytose contenant l'acétylcholine, par scission des protéines permettant cet arrimage. La fusion des vésicules et de la membrane ne peut avoir lieu, l'acétylcholine n'est pas libérée dans la fente synaptique.

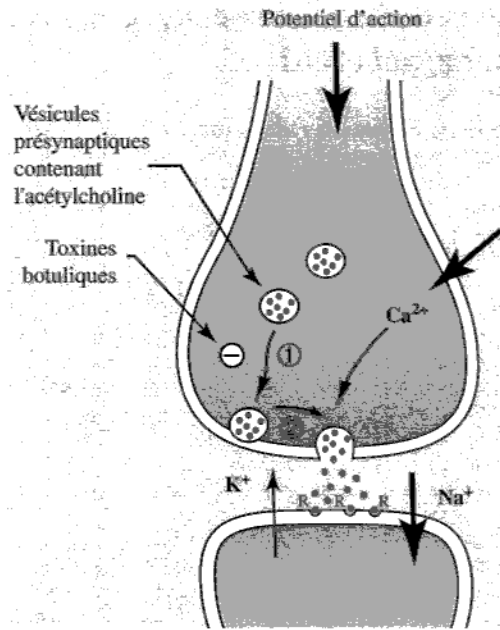


Fig. 9 – Mécanisme d'action des toxines botuliques

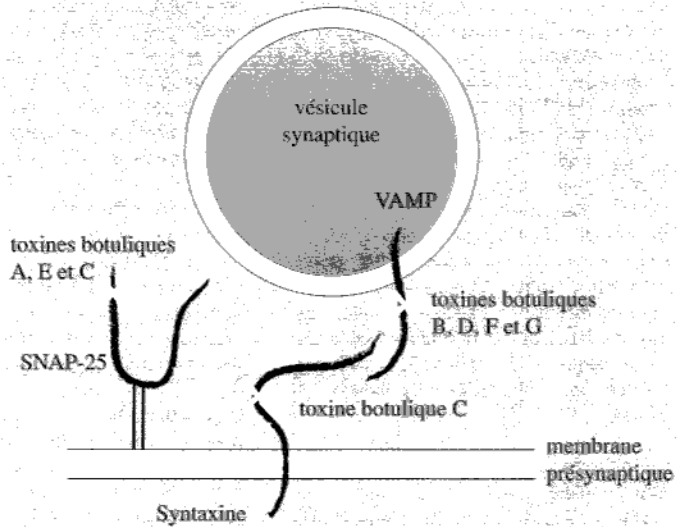


Fig. 10 – Cibles intraneuronales

2.3.4. Symptomatologie

L'injection des toxines reproduit les symptômes du botulisme.

La période d'incubation est très variable, en général de deux à vingt-quatre heures. Apparaissent d'abord une paralysie des muscles de l'accommodation avec diplopie (vision double), des difficultés à la déglutition, la sécheresse de la bouche.

Dans les formes graves, les paralysies atteignent les muscles respiratoires. Le botulisme présente une mortalité de 50 % aux États-Unis, seulement 4 % en France, les sérotypes A et E semblant les plus dangereux.

2.3.5. Mesures préventives

Certaines mesures préventives peuvent éviter l'intoxication botulique :

- faire jeûner les animaux avant l'abattage et bien conduire celui-ci ;
- éviter la contamination des carcasses par des souillures telluriques ;
- appliquer aux conserves des traitements thermiques suffisants ;
- maintenir les produits non stérilisés à une température inférieure à +4 °C.

Les denrées ayant une teneur en NaCl supérieure à 10 %, ou une teneur en nitrites supérieure à 200 ppm, ou un pH inférieur à 4,5, ou encore une Aw inférieure à 0,93 seront peu favorables au développement de *Clostridium botulinum* : on trouvera dans ces données l'explication de certains procédés de stabilisation.

Foyers de botulisme de type B liés à la consommation de saucisson hallal, France, août 2003

Deux foyers confirmés de botulisme de type B ont été déclarés aux directions départementales des affaires sanitaires et sociales (Ddass) le 1er septembre 2003: un foyer familial de 3 cas dans les Bouches du Rhône et un cas isolé en Loire-Atlantique.

Les 1ers symptômes de botulisme des 4 patients sont apparus le 25 août 2003. Ils ont tous présenté une forme modérée de botulisme (sécheresse buccale, dysphagie, diplopie, troubles de l'accommodation). Ils ont été hospitalisés quelques jours, mais n'ont pas nécessité d'assistance respiratoire. L'évolution a été favorable pour tous.

Ces patients avaient en commun la consommation de saucisson hallal de même marque, fabriqué avec de la viande de bœuf et de la viande de volaille produit par un même établissement situé dans les Bouches du Rhône.

De la toxine botulique de type B a été mise en évidence par le Centre national de référence des bactéries anaérobies et du botulisme dans le saucisson consommé par le patient de Loire-Atlantique.

La direction départementale des services vétérinaires (DDSV) des Bouches du Rhône a réalisé une enquête au sein de l'établissement producteur pour identifier les lots potentiellement contaminés, l'origine de la contamination et la distribution géographique des produits vendus par cette entreprise.

Le 5 septembre, un retrait portant sur les 3 lots différents de saucisson qui étaient en vente dans les magasins où s'approvisionnent les cas, a été réalisé par la Direction générale de l'alimentation, de la pêche et des affaires rurales. Un communiqué de presse a été diffusé.

L'origine de la contamination n'ayant pu être identifiée, le retrait a été étendu le 12 septembre à tous les produits ayant une DLC antérieure au 12 mars 2004 (saucissons, mortadelles, pavés, roulades et délices et bloc de dinde sous boyaux plastiques).

Par ailleurs, ces produits étant distribués en Italie, aux Comores et en Espagne, des alertes européennes ont été diffusées les 12 et 22 septembre.

Trois nouveaux cas suspects de botulisme ont été identifiés le 19 septembre et sont en cours de confirmation. Ces trois cas familiaux ont présenté des signes cliniques de botulisme le 1er et 2e septembre. Ils auraient consommé du saucisson et d'autres produits hallal avant le retrait du 5 septembre. L'investigation sur l'origine des produits consommés par ces cas est en cours.

Le botulisme est une neuro-intoxication due à une puissante neurotoxine bactérienne, produite par *Clostridium Botulinum*. Sept types de toxine botulique (A, B, C, D, E, F, G) ont été décrites; le botulisme humain est essentiellement associé aux toxinotypes A, B et E [1,2].

Le plus souvent de 12 à 36 heures, la période d'incubation du botulisme peut varier de 2 heures à 8 jours selon la quantité de toxine ingérée. Cliniquement, le botulisme est caractérisé par des signes d'atteintes neurologiques résultant de l'action des toxines botuliques. Les premières manifestations cliniques consistent généralement en des troubles oculaires (diplopie, troubles de l'accommodation, etc.). Puis survient une dysphagie avec sécheresse buccale parfois associée à une dysphonie. La constipation, la dysurie et l'asthénie physique sont des signes très constants. Dans les formes graves, des paralysies peuvent atteindre les muscles périphériques et respiratoires, nécessitant une assistance respiratoire.

La létalité du botulisme est variable selon le type de toxine en cause, les toxinotypes A et E étant responsables des formes les plus graves [3]. En France, la létalité rapportée n'a jamais dépassé 6 % depuis les années 50 et depuis le début des années 90, les décès par botulisme rapportés sont rares [3, 4]. En France, le botulisme, maladie à déclara-

tion obligatoire, est une affection rare; son incidence est stable depuis 1990 avec une moyenne annuelle de 15 foyers et 28 cas. Le toxinotype B est le plus fréquemment mis en cause et est impliqué dans 87 % des foyers. En France, les foyers de botulisme recensés sont a priori d'origine alimentaire. Les aliments les plus fréquemment en cause sont des salaisons, charcuteries et conserves de fabrication familiale. Depuis 1990, des aliments d'origine commerciale ou industrielle ont été impliqués ou mis en cause dans la survenue de 23 foyers sur 137 [4, 5].

Références

- 1- Popoff MR., Carlier JP. Botulisme, épidémiologie, approches thérapeutiques et préventives, utilisation thérapeutique des neurotoxines. *Antibiotiques* (2001); 3: 149-162.
- 2- Woodruff BA., Griffin PM., McCroskey LM. et al. Clinical and laboratory comparison of botulinum toxin A, B and E in the United States, 1975-1988. *J Infect Dis* (1992); 166:1281-6.
- 3- Haeghebaert S., Popoff MR., Carlier JP., Pavillon G., Delarocque-Astagneau E. Caractéristiques épidémiologiques du botulisme humain en France, 1991-2000. *BEH n°14/2002*: 57-59.
- 4- Carlier JP, Henry C, Lorin V., Popoff MR. Le botulisme en France à la fin du deuxième millénaire (1998-2000). *BEH n°9/2001*: 37-39.
- 5- Haeghebaert S., Carlier JP., Popoff MR. Caractéristiques épidémiologiques du botulisme humain en France, 2001 et 2002. *BEH n°29/2003*: 129-30.

Équipe d'investigation :

Institut de veille sanitaire, les Directions départementales des affaires sanitaires et sociales et les Directions départementales des services vétérinaires des Bouches du Rhône et de Loire Atlantique, le Centre National de Référence des bactéries anaérobies et du botulisme et la Direction Générale de l'Alimentation.

Nombre et évolution des foyers de botulisme 1991-2004

Botulisme : nombre de foyers selon le type de toxine ¹															
Type de toxine	Année														Total toxine
	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	
Type de toxine	0	0	0	0	0	0	2	1	3	1	1	0	0	0	8
A															
AB	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2
B	17	12	9	13	8	2	6	12	10	10	13	12	5	14	143
E	0	0	0	0	0	0	2	2	3	0	0	1	2	1	11
Non typée	1	0	1	1	0	1	2	2	4	3	4	1	1	1	22
Négatif ou non recherchée	1	3	2	0	2	2	2	0	0	1	0	3	0	2	18
Total année	19	15	12	14	10	5	14	17	21	15					

(1) document de l'institut de veille sanitaire

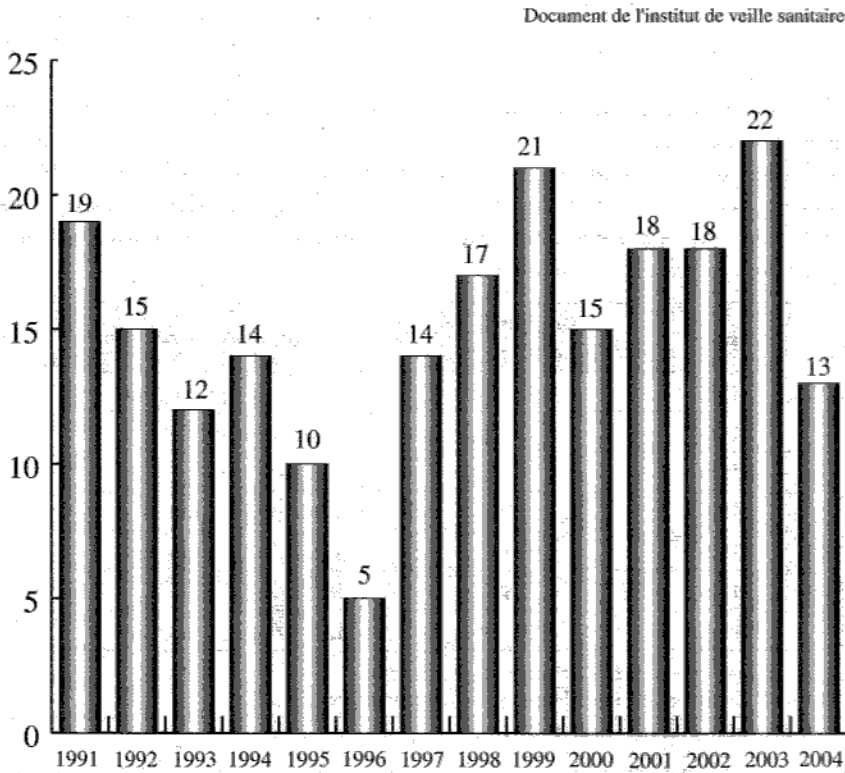


Fig. 11 – Évolution du nombre de foyers de botulisme

Document 4 – Document de l'Institut National de veille sanitaire

2.4. Le cas particulier de *Listeria monocytogenes* (voir document 5 - Extraits du BEH n° 4/2000)

2.4.1. Position taxonomique

Les bactéries du genre *Listeria* sont des petits coccobacilles coccoïdes à Gram+, non sporulants, mobiles, dépourvus d'oxydase, possédant une catalase. Elles sont très largement répandues dans la nature. On les trouve régulièrement dans le sol, dans l'eau, sur les végétaux. Ce sont des bactéries cryophiles qui poursuivent leur croissance à +4 °C.

Parmi les sept espèces actuellement répertoriées, *Listeria monocytogenes* est responsable de la plupart des infections humaines ou animales.

2.4.2. Symptomatologie

En médecine vétérinaire, *Listeria monocytogenes* est à l'origine de nombreux cas d'encéphalites, de septicémies, d'avortements et de mammites. Les listérioses animales sont en recrudescence. En médecine humaine, cette bactérie est mise en cause dans les infections chez la femme enceinte et le nouveau-né, mais aussi chez les adultes, particulièrement dans les cas d'immunodépression. Chez ces derniers, il s'agit, dans 70 % des cas, d'une méningo-encéphalite avec atteinte électorale du tronc cérébral et des nerfs crâniens ; plus rarement, la listériose se manifeste par une septicémie sans atteinte nerveuse. Les femmes enceintes présentent en général une maladie inapparente (syndrome pseudo-grippal, pharyngite ou diarrhée banale). L'infection transplacentaire de l'enfant peut entraîner, quelques jours ou quelques semaines plus tard, un avortement ou un accouchement prématuré d'un enfant infecté (atteinte septicémique souvent associée à un syndrome méningé).

L'étude antigénique (sérotypique) des souches isolées chez les malades a révélé que parmi les treize sérovars de *Listeria monocytogenes*, trois seulement sont responsables de la presque totalité des cas pathologiques : les sérotypes 1/2a, 1/2b et 4b.

2.4.3. Épidémiologie

De nombreuses épidémies de listérioses ont pu être attribuées, sur la base d'enquêtes épidémiologiques, à la consommation d'aliments contaminés. La première date de 1981, au Canada, du chou cru fut à l'origine d'une toxi-infection sévère provoquant la mort de quarante et une personnes. Peu après, en Californie, des toxi-infections collectives à *Listeria* ont été reliées à la consommation de certains fromages (fromages américains) entraînant la mort de soixante personnes. D'autres épisodes ont été signalés en Suisse

où le vacherin suisse serait à l'origine de trente-deux décès entre 1983 et 1987. La presse médicale anglo-saxonne rapporte régulièrement des épidémies de listériose attribuées à une contamination d'origine alimentaire : fromages à pâte molle non pasteurisés (*Lancet-4 novembre 1989*), mais aussi laitues crues préemballées (*Lancet-18 mars 1989*) et poulets vendus cuits en restauration rapide (*11 mars 1989*).

Plus récemment, une épidémie de listériose a été identifiée dans la région de Swindon au Royaume-Uni au cours de l'automne 2003. Cinq cas ont été détectés chez des femmes enceintes. Il est probable que quatre d'entre elles avaient mangé des sandwichs préemballés provenant d'un point de vente du même hôpital. Dix cas de listériose ont été déclarés dans le nord-ouest de la Suisse qui ont été reliés à la consommation d'un fromage à pâte molle (tomme) fabriqué et distribué localement.

En France, des épidémies, provoquées par des lysovars différents, ont permis d'incriminer divers produits de charcuterie (en particulier de la langue de porc en gelée et des rillettes).

Année	Nombre de cas (Nombre de décès)	Origine supposée
1992	279 (85)	Langue de porc en gelée*
1993	39 (3)	Rillettes de porc
1995	33	Brie de Meaux
1997	14	Pont l'Évêque, Livarot
1999	3 (2)	Époisses**
1999	6 (2)	Rillettes de porc
1999-2000	32 (10)	Langue de porc en gelée*

* Origine majoritaire de la contamination
 ** Ce fromage a été fabriqué à partir de lait pasteurisé.

Source BEH 4/2000 (25 janvier 2000)

Tableau 4 – Les épidémies de listériose en France (origine ASEPT SAS - BP 2047 - 53020 Laval)

Le rôle de contaminations croisées lors de la fabrication de ces produits a été mis en évidence. En fait, il convient de souligner que, si la transmission alimentaire de la listériose est maintenant bien établie, il apparaît qu'une faible concentration de *Listeria* dans les denrées alimentaires ne représente pas un danger pour la santé, à l'exception de « population à risque » : femmes enceintes, personnes âgées, personnes immunodéprimées, personnes atteintes de troubles métaboliques ou d'affections intercurrentes. Les aliments incriminés sont indiqués sur le tableau ci-dessous

Aliments	Nombre de cas
Produits laitiers	597
Produits carnés	741
Produits végétaux	91
Produits de la mer	32
Ovoproduits	33

Tableau 5 – Aliments associés à la listériose dans le monde
 (origine ASEPT SAS - BP 2047 - 53020 Laval)

Les aliments qui provoquent des listérioses sont souvent contaminés à fort taux (>10⁵/g).

La transmission alimentaire est liée au caractère ubiquiste et saprophyte de la bactérie (sol, végétaux...) qui contamine fréquemment l'alimentation à faibles doses. *Listeria monocytogenes* présente la particularité d'avoir une température de croissance comprise entre 3 °C et 45 °C, avec optimum 30-37 °C. Cette capacité de croître lentement à basse température explique l'importance des contaminations alimentaires lorsqu'elles sont amplifiées par un long séjour au froid avant consommation.

Signalons également que *Listeria monocytogenes* est facilement détruite par la chaleur (30 min à 55 °C, 1-2 min à 100°C), elle supporte des pH de 5,6-9,6 (pH optimum 7,2-7,6), mais est très sensible à un pH acide. Les yaourts et les produits laitiers pasteurisés ne présentent donc aucun danger.

2.4.4. Mécanisme de l'infection à *Listeria monocytogenes*

La pénétration des *Listeria* est principalement réalisée au niveau des macrophages et des monocytes. Plusieurs protéines constitutives de la bactérie interviennent successivement pour expliquer le processus invasif.

1 - L'internaline, protéine de surface, commune à d'autres bactéries à Gram+, facilite l'adhésion et provoque (par liaison avec les intégrines cellulaires) des modifications du cytosquelette, entraînant la formation d'un phagosome.

2 - À l'intérieur du phagosome, les *Listeria* subissent des conditions défavorables susceptibles d'entraîner leur destruction: acidification par les pompes à protons, burst oxydatif. L'action d'une protéine cytolitique, la listériolysine, associée à une phosphatidyl-inositol phospholipase, conduit à leur libération par éclatement de la vésicule. La survie de *Listeria monocytogenes* dépend donc de la rapidité d'action de ces substances.

3 - L'action d'une autre protéine, l'ACT A, conduit à la polymérisation, autour de la bactérie, de l'actine F pour produire de l'actine G qui permet leur déplacement à l'intérieur du phagocyte à une vitesse de 1 μm par seconde. Les *Listeria* peuvent ainsi envahir les cellules voisines et s'y multiplier.

In vivo, les *Listeria*, parvenues dans l'intestin avec les aliments ingérés, pénètrent la paroi intestinale au niveau des plaques de Peyer (qui contiennent des macrophages). La propagation se fait ensuite vers les entérocytes. Elles gagnent le chorion et pénètrent dans les vaisseaux afin d'atteindre les organes cibles privilégiés que sont le système nerveux central et le foie.

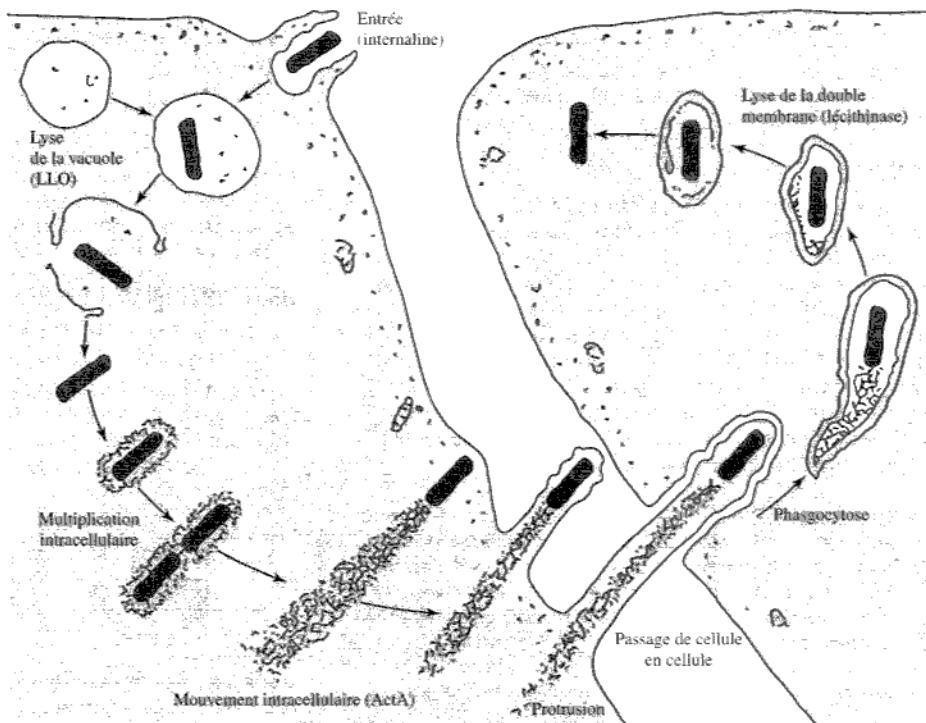


Fig. 11 – Mécanisme du pouvoir d'invasion de *Listeria monocytogenes* dans les cellules de mammifères (d'après P. Berche)

2.4.5. Mesures préventives

Un renforcement des mesures d'hygiène et la révision des plans d'hygiène dans les établissements assurant des préparations à base de denrées d'origine animale ont été mis en place. Le ministère de la Santé a diffusé des recommandations pour la prévention des listérioses chez les femmes enceintes, les patients immunodéprimés et les personnes âgées.

Recommandations pour les personnes à risque

- Éviter les aliments à risques
- Éviter de consommer des fromages au lait cru (ainsi que le fromage vendu râpé)
- Éviter la consommation de poissons fumés, de coquillages crus, de surimi, de tarama...
- Éviter de consommer crues des graines germées telles que les graines de soja
- Éviter les produits de charcuterie cuite tels que les rillettes, pâtés, foie gras, produits en gelée...
- Pour les produits de charcuterie type jambon, préférer les produits préemballés qui présentent moins de risque d'être contaminés.
- Enlever la croûte des fromages.
- Laver soigneusement les légumes crus et les herbes aromatiques.
- Cuire les aliments crus d'origine animale (viande, poissons, charcuterie crue telle que les lardons).
- Conserver les aliments crus (viande, légumes, etc.) séparément des aliments cuits ou prêts à être consommés.
- Après la manipulation d'aliments non cuits, se laver les mains et nettoyer les ustensiles de cuisine qui ont été en contact avec ces aliments.
- Nettoyer fréquemment et désinfecter ensuite avec de l'eau javellisée son réfrigérateur.
- S'assurer que la température du réfrigérateur est suffisamment basse (4 °C).
- Respecter les dates limites de consommation.

BOUFFÉE ÉPIDÉMIQUE DE LISTERIOSE LIÉE À LA CONSOMMATION DE RILLETES

France, octobre- décembre 1999
 Synthèse des données disponibles au 12 janvier 2000

H de Valk¹, J Rocourt², F Lequerrec³, Ch Jacquet⁴, V Vaillant¹, H Portal⁵, O Pierre⁴,
 V Pierre⁵, F Stainer⁶, G Salvat⁶, V Goulet¹.

CONTEXTE

En France, la surveillance de la listériose est assurée par le Centre national de référence des *Listeria* (CNR, Institut Pasteur, Paris) qui centralise et caractérise les souches de *Listeria monocytogenes* provenant des laboratoires de microbiologie, et par la Déclaration Obligatoire (DO) effectuée par les médecins auprès des Directions Départementales des Affaires Sanitaires et Sociales (DDASS). Pour chaque cas déclaré, les Médecins Inspecteurs de Santé Publique (MISP) complètent systématiquement la DO par un questionnaire portant sur l'alimentation du patient au cours des 2 mois précédant le début des symptômes. La DO et les questionnaires alimentaires sont ensuite envoyés systématiquement à l'InVS.

Les deux systèmes, CNR et DO, se renforcent mutuellement. En cas de réception d'une souche isolée d'un patient qui n'a pas fait objet d'une DO, l'InVS signale l'isolement à la DDASS concernée afin d'obtenir la déclaration et le questionnaire alimentaire correspondant. Inversement, l'envoi de la souche au CNR est demandé systématiquement en cas de déclaration d'un cas.

La surveillance réalisée par le CNR permet de détecter parmi les souches isolées chez l'homme une augmentation inhabituelle du nombre de souches ayant les mêmes caractéristiques. Cette constatation déclenche une alerte et une investigation menée par une cellule de crise composée de représentants de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), du CNR, de la Direction Générale de l'Alimentation (DGA) du Ministère de l'Agriculture, de la Direction Générale de la Concurrence de la Consommation et de la Répression des fraudes (DGCCRF) et de la Direction Générale de la Santé (DGS).

Par ailleurs, le CNR possède également une base de souches d'origine alimentaire constituée à partir des souches adressées pour caractérisation par des laboratoires vétérinaires et d'hygiène alimentaire. En cas d'alerte, les caractéristiques des souches humaines appartenant à l'alerte sont comparées à celles des souches des aliments suspectés par l'investigation épidémiologique.

Le questionnaire alimentaire ne permet pas d'identifier l'aliment responsable de chaque cas, car la simple notion de consommation d'un ou plusieurs aliments à risque ne permet pas d'incriminer un aliment comme source de l'infection. En revanche, le rôle de ce questionnaire est de pouvoir disposer immédiatement en cas d'alerte, d'un questionnaire alimentaire complété précocement par rapport à la maladie. Ainsi, l'introduction de la DO et du questionnaire alimentaire systématique du patient a permis de renforcer l'efficacité du système et d'accélérer considérablement les investigations épidémiologiques à mettre en œuvre en cas d'alerte donnée par le CNR. Lors des deux dernières épidémies, le système interactif a permis d'identifier rapidement l'aliment en cause permettant la mise en œuvre de mesures de gestion du danger et de limiter le nombre de cas.

L'ALERTE

Le CNR a informé la cellule de crise le 29/12/99 de l'existence de 4 cas de listériose survenus entre le 25/10/99 et le 22/11/99 dus à *Listeria monocytogenes* sérovar 4b et lysovar 2389 : 3552 : 2425 : 1444 : 3274 : 2671 : 47 : 52 : 108 : 340 présentant les mêmes caractéristiques en macrorestriction d'ADN. Un 5^e et un 6^e cas ont ensuite été identifiés respectivement le 30/12/99 et le 5/01/2000.

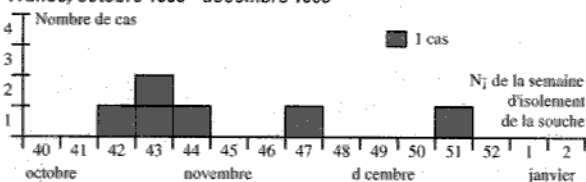
(1) InVS
 (2) CNR des *Listeria*
 (3) DGA
 (4) DGCCRF
 (5) DGS
 (6) AFSSA

Le CNR signalait également 21 souches de *Listeria* d'origine alimentaire présentant les mêmes caractéristiques (sérotype, lysotype) que les souches d'origine humaine, isolées de plusieurs types d'aliments (charcuterie, viande, lait ou produit laitier, produit de la pêche).

DESCRIPTION DE L'ÉPIDÉMIE

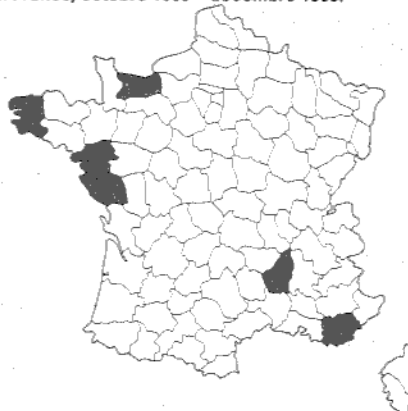
Au 12 janvier 2000, 6 cas ont été identifiés. Ils sont survenus entre le 18/10/99 et le 24/12/99 (dates d'isolement des souches) (figure 1).

Figure 1 - *Listeria* sérovar 4b et lysovar 2389:3552:2425:1444:3274:2671:47:52:108:340, (mêmes pulsovars)
 Distribution hebdomadaire des cas
 France, octobre 1999 - décembre 1999



Les patients résident dans 6 départements différents : Ardèche, Calvados, Finistère, Loire-Atlantique, Var, Vendée. Quatre de ces départements sont situés dans l'ouest de la France (figure 2).

Figure 2 : *Listeria* sérovar 4b, lysovar 2389:3552:2425:1444:3274:2671:47:52:108:340 (mêmes pulsovars)
 Répartition géographique des cas en fonction de leur département de résidence. France, octobre 1999 - décembre 1999.



Quatre patients adultes, avec une pathologie chronique entraînant une immunodépression prédisposant à la listériose (transplantation rénale (2), transplantation hépatique, cirrhose plus diabète), ont fait une forme septicémique. Un patient, âgé de 78 ans sans pathologie connue, a fait une forme neuroméningée. Le 6^e patient est une femme enceinte chez qui l'infection a donné lieu à un accouchement prématuré au terme de 26 semaines. Deux patients sont décédés : un des patients avec une pathologie prédisposante et l'enfant prématuré décédé à l'âge de 19 jours.

INVESTIGATION

À la suite de l'alerte, l'InVS a réalisé une enquête exploratoire afin de générer une hypothèse sur un aliment véhicule de transmission. Cette enquête a consisté à analyser les questionnaires alimentaires remplis dans le cadre de la DO pour les cas appartenant à l'alerte. Cinq questionnaires avaient été complétés par les services de la DDASS après interrogatoire du patient ou, si celui-ci ne pouvait être interrogé, auprès de quelqu'un de son entourage proche. Cette enquête a montré que les 5 patients avaient consommé des rillettes dont 4 avec un lieu d'achat appartenant à une même chaîne de magasins. Ces informations ont été transmises aux autres partenaires de la cellule de crise.

Lors de la survenue du premier cas en octobre, qui était alors un cas isolé, des prélèvements avaient été réalisés par les services vétérinaires départementaux sur les aliments présents dans le réfrigérateur du patient au moment de la maladie. *Listeria monocytogenes* avait été isolée de deux pots de rillettes (porc et canard) entamés. Le taux de contamination était élevé : 18 000 UFC/g pour les rillettes de porc et 500 000 UFC/g pour les rillettes de canard. Dès que ces résultats ont été connus, une visite d'inspection a été réalisée par les services vétérinaires le 15/11/99, dans l'établissement de fabrication sur les 2 types de rillettes consommées par le cas. Cette visite n'avait révélé aucune non conformité sur ces rillettes, ni sur les conditions de production. De plus des prélèvements avaient été réalisés sur les lots incriminés présents dans l'échantillonnage et tous les résultats étaient négatifs. Devant l'absence de non conformité chez le producteur, l'hypothèse sur l'origine de la contamination retenue comme la plus probable était une contamination chez le consommateur.

Les 2 souches issues des prélèvements réalisés sur les 2 pots de rillettes chez le patient figuraient parmi les 21 souches alimentaires signalées par le CNR. L'investigation de la DGAI a montré que les rillettes prélevées chez le patient provenaient du producteur qui approvisionne la chaîne des magasins cités comme lieu d'achat par les cas de l'alerte. La présence de la souche dans l'établissement a été confirmée par le Centre Technique de la Salaison des Charcuteries et des Conserves de Viande (CTSCCV) qui l'avait isolée lors d'un contrôle de certification.

Les services vétérinaires ont réalisé une nouvelle enquête étendue à tous les types de rillettes et aux autres produits (langue de porc) chez ce producteur. Cette enquête a mis en évidence des auto-contrôles positifs (contamination faible : < 10 *Listeria*/gramme) sur certains lots de rillettes et un lot de langue de porc produits dans la période de septembre à décembre. Certains de ces lots avaient été partiellement ou entièrement distribués. Les conditions de production, l'état des locaux et le niveau de l'hygiène ont été jugés comme très bons. La DGCCRF a réalisé de nombreux prélèvements sur des rillettes du producteur incriminé et d'autres producteurs, dont l'analyse est en cours.

MESURES PRISES

Il a été décidé par les différents partenaires de la cellule de crise et l'AFSSA, en accord avec le producteur, de procéder à une information des consommateurs et à un retrait de la vente de tous les types de rillettes et de la langue de porc produits par cette entreprise. L'entreprise a été fermée pour nettoyage et désinfection et ne reprendra son activité qu'après vérification de l'efficacité de cette mesure et amélioration du système d'autocontrôle, notamment en ce qui concerne la gestion interne des non conformités et la traçabilité des produits. Il a été également décidé de mener une enquête sur le maintien de la chaîne du froid dans toute la phase comprise entre la sortie de l'usine et la vente de ces produits aux consommateurs notamment dans la chaîne de distribution citée par 4 patients (DGCCRF et DGAI).

Par communiqué de presse, il a été recommandé aux consommateurs de consulter un médecin en cas de fièvre isolée ou accompagnée de maux de tête survenant dans les 2 mois suivant la consommation de l'aliment conformément à l'avis du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. Cet avis portant sur l'opportunité d'une antibioprophylaxie pour les personnes ayant consommé un aliment contaminé par *Listeria monocytogenes*, spécifie qu'il n'y a pas lieu de recommander une antibioprophylaxie systématique en cas de consommation d'un aliment contaminé par *Listeria monocytogenes*.

Les autorités sanitaires des pays européens ont été informées de cette épidémie par l'intermédiaire des réseaux d'alerte et de surveillance communautaires (réseau des maladies transmissibles et système « Rapid Alert System for Food »).

La surveillance se poursuit afin d'identifier les nouveaux cas qui pourraient encore survenir du fait de la longue durée d'incubation (jusqu'à 2 mois).

DISCUSSION

L'organisation actuelle de la surveillance de la listériose et des investigations des alertes a permis d'identifier rapidement le véhicule et la source de l'épidémie et de prendre des mesures de gestion du danger. Néanmoins, cet épisode soulève plusieurs points qui nécessitent d'être pris en compte dans le futur.

Cette épidémie de listériose associée à la consommation de rillettes met de nouveau en évidence le risque vis-à-vis de la listériose présenté par ce produit. La survenue de plusieurs cas de listériose malgré une contamination très faible à la production laisse supposer une multiplication bactérienne entre la production et la consommation. Cette multiplication a pu être favorisée par un mauvais respect de la chaîne du froid au niveau du transport, de la distribution et du stockage y compris chez le consommateur. Elle est aussi favorisée par un délai de péremption très long (jusqu'à 45 jours) pour ce produit sensible. La date limite de consommation (DLC) devrait être raccourcie de manière importante pour éviter d'aboutir à des concentrations élevées de *Listeria* à la DLC en cas de contamination très faible voir indétectable par les plans d'échantillonnage habituellement utilisés à la production.

L'avis du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France sur l'opportunité d'une antibioprophylaxie pour les personnes ayant consommé un aliment contaminé par *Listeria monocytogenes* a été très utile pour orienter les médecins dans leur conduite à tenir devant un consommateur en l'absence de symptômes. A l'occasion de cette alerte, il a été demandé aux DDASS de diffuser cet avis aux Centres anti-poison et aux Services d'Aide Médicale d'Urgence (SAMU) du territoire français. La conduite à tenir devant un consommateur de rillettes présentant des symptômes a posé des problèmes aux médecins, en particulier du fait de la similarité des symptômes évocateurs de listériose et des symptômes de la grippe actuellement épidémique en France.

Cette épidémie est l'occasion de souligner à nouveau la nécessité de renforcer l'information, par tous les moyens disponibles, y compris par l'intermédiaire des professionnels de santé vers les populations les plus à risque sur les aliments à éviter et sur les pratiques à respecter.

2.5. Infections virales d'origine alimentaire (voir document 6 - Extraits BEH n° 30/1998)

2.5.1. L'hépatite A

La transmission de l'hépatite A se fait essentiellement par les objets, l'eau ou des aliments contaminés. Le virus est éliminé par les selles des porteurs et des malades. Le risque lié à la consommation des coquillages ne peut être éliminé. Les eaux dans lesquelles il se développe sont contrôlées indirectement par l'évaluation du nombre des coliformes fécaux et non par la recherche directe du virus. Seule, une cuisson de quatre minutes à 90 °C détruit le VHA (virus de l'hépatite A). En dehors des coquillages consommés crus, l'hépatite A peut être transmise par l'eau (c'est la cause principale de contamination) ou par des aliments contaminés par une personne excréant le virus et ne se lavant pas les mains. Si les précautions d'hygiène étaient respectées, le VHA ne se transmettrait pas: le lavage des mains est la meilleure prévention. L'éducation sanitaire a d'ailleurs eu un rôle important dans la diminution du nombre de cas, diminution obtenue dans tous les pays dont le niveau d'hygiène est convenable et qui sont aujourd'hui des zones de faible endémicité. Le nombre de cas déclarés en milieu scolaire est, par exemple, de 31 sur 1999-2000 en France. Cependant, le risque de contamination reste très élevé en Afrique, Amérique centrale, nord de l'Amérique du Sud, Inde, Russie où le risque de contamination par le VHA est 40 fois celui de la fièvre typhoïde, 800 fois celui du choléra.

2.5.2. Le virus de Norwalk

Plusieurs épidémies collectives dues à l'absorption de coquillages crus contaminés par des virus ont été rapportées depuis 1996. Elles ont presque toujours été provoquées par une contamination fécale humaine de la zone de production. Parmi les agents mis en cause, figure le VHA (voir 2.5.1.), mais aussi les calcivirus humains, dont le virus de Norwalk.

2.6 Algues.

2.6.1. Les phycotoxines

Les phycotoxines sont des toxines produites par des algues planctoniques microscopiques. Elles peuvent se transmettre le long de la chaîne alimentaire et provoquer des intoxications.

Les espèces d'algues qui produisent des toxines puissantes appartiennent surtout au groupe des dinoflagellés. Au sein des 5000 espèces phytoplanctoniques connues, seulement 70 espèces ont la capacité de produire des toxines qui peuvent atteindre l'homme suite à la consommation de poissons et de fruits de mer contaminés par l'accumulation lors de la filtration de grandes quantités d'eau de mer chargée de micro-algues toxiques.

Cinq syndromes d'intoxication par des phycotoxines ont été décrits :

- l'intoxication paralytique par les fruits de mer;
- l'intoxication diarrhéique par les fruits de mer;
- l'intoxication amnésique par les fruits de mer;
- l'intoxication neurologique par les fruits de mer;
- la ciguatera.

Le tableau suivant récapitule schématiquement les espèces toxigènes et les phycotoxines produites, ainsi que les syndromes d'intoxication et les principaux vecteurs le long de la chaîne alimentaire.

Algues	Toxines	Zones	Vecteurs	Syndromes
<i>Alexandrium</i> : <i>A. tamarense</i> <i>A. catenella</i> <i>A. acatenella</i> <i>A. minutum</i> <i>A. fundyense</i> <i>A. lusitanicum</i> <i>Gymnodium</i>	Saxitoxines	Tempérées	Mollusques et crustacés	Intoxication paralytique par fruits de mer (I.P.F.M. ou P.S.P.)
<i>Gymnodium catenatum</i>	Saxitoxines STX Néosaxitoxines NEO	Tropicales		
<i>Pyrodinium bahamense</i> <i>var. compressa</i>	Gonyautoxines GTXs			
<i>Dinophysis</i> sp. <i>Prorocentrum</i> sp.	Acide okadaïque Dinophysistoxines DTXs	Tempérées	Coquillages	Intoxication diarrhéique par fruits de mer (I.D.F.M. ou D.S.P.)

Algues	Toxines	Zones	Vecteurs	Syndromes
<i>Nitzschia pungens</i> (<i>pseudonitzschia</i> sp.)	Acide domoïque	Tempérées	Coquillages	Intoxication amnésique par fruits de mer (I.A.F.M. ou A.S.P.)
<i>Gambierdiscus toxicus</i>	Maitotoxine MTX Ciguatoxines CTXs	Tropicales	Poissons	Ciguatera
<i>Ptychodiscus brevis</i>	Brévétotoxines BTXs	Tropicales	Coquillages	Intoxication neurologique par fruits de mer (I.N.F.M. ou N.S.P.)

Tableau 6 – Phytoplanctons, phycotoxines et intoxications alimentaires

2.6.2. Intoxications à phycotoxines ayant une incidence en France métropolitaine et dans les DOM

• La ciguatera

C'est une intoxication paralysante survenant à la suite de la consommation de poissons subtropicaux et tropicaux qui se nourrissent d'une algue nommée *Gambierdiscus toxicus*, un dinoflagellé qui produit une neurotoxine.

Cette intoxication commence à partir de 6h après l'ingestion par des troubles digestifs précoces (diarrhées), suivent des vomissements, diarrhées, hyperesthésies, myalgies, arthralgies, paresthésies et un prurit plus ou moins tenace. L'incidence morbide varie de 3 à 10 pour mille dans les populations concernées. Quasiment tous les poissons sont concernés, les barracudas, les carangues et les murènes étant les plus dangereux à consommer aux Antilles. Dans l'Océan Pacifique, ce sont plutôt les mérours, les lutjans, les murènes, les chirurgiens et les perroquets qui sont responsables des intoxications ciguatriques

• Les gastro-entérites à *Dinophysis acuminata*

Les moules sont les principaux coquillages concernés par cette contamination, mais les palourdes, clams, et coquilles Saint-Jacques ont pu être incriminés; seules les huîtres n'ont pas été mises en cause.

Les *Dinophysis* toxiques sévissent à l'état endémique sur les côtes françaises, dans le Finistère et dans le Morbihan, mais aussi, à un moindre degré, en Normandie, dans la partie ouest de la Méditerranée, ainsi qu'en Corse. Le nombre d'intoxications élevé (4000 en 1983 et 2000 en 1984) a baissé rapidement (moins de 10 à partir de 1985) après la mise en place d'un réseau de surveillance IFREMER et la fermeture préventive des zones contaminées.

Les symptômes des gastro-entérites à *Dinophysis acuminata* (douleurs abdominales avec diarrhée associée, sans fièvre) apparaissent toujours en moins de 12 heures après le repas toxique de coquillages. Ces intoxications sont saisonnières et ont été reliées à la présence de divers *Dinophysis* dans l'eau de mer dans les coquillages consommés.

• Intoxication à *Alexandrium minutum*

Alexandrium minutum est plus rare que le *Dynophysis* mais aussi plus dangereux. Ce dinoflagellé produit différentes toxines paralysantes, dont la saxitoxine et les gonyautoxines, qui se retrouvent, concentrées, dans tous les coquillages (huîtres comprises) et qui engendrent très rapidement - moins de trente minutes après ingestion - des symptômes allant des simples fourmillements et vertiges jusqu'à la perte de coordination motrice et, dans les cas les plus graves, aux troubles respiratoires et à la paralysie.

D'autres espèces du genre *Alexandrium*, particulièrement toxiques, ont ainsi été impliquées dans des décès survenus ces dernières années en Espagne, aux États-Unis ou au Canada. Toutes ces toxines sont thermostables, c'est-à-dire résistantes à la chaleur, si bien que la cuisson ne diminue en rien leurs effets néfastes.

Les risques d'intoxication associés à l'espèce *Alexandrium minutum*, qui n'est observée que depuis dix ans dans les eaux françaises, restent pour l'essentiel localisés à quelques secteurs du nord de la Bretagne (abers, baie de Morlaix, Rance). Toutefois, il semble que cette espèce gagne du terrain, puisque, pour la première fois, elle a été également repérée plus récemment, à des concentrations assez importantes, en Poitou-Charentes.

CONTAMINATION VIRALE DE COQUILLAGES RESPONSABLES D'UNE ÉPIDÉMIE DE GASTRO-ENTÉRITES A POITIERS, MARS 1997

L. MIOSSEC¹, F. LE GUYADER¹, S. HAEGHEBAERT², PH. GASNIER³, J.-Y. BELLIER³, V. VAILLANT², P. CAMUS⁴, M. POMMEPUY¹, M.-J. ABOU-SALEH⁵, PH. CLAVELIN⁶, J.-P. BO BO⁷, D. MASSON⁸, J.-C. DÉSENCLOS²

INTRODUCTION

Les coquillages sont fréquemment associés à des épidémies de gastro-entérites infectieuses d'origine bactérienne ou virale. Grâce aux nouvelles techniques analytiques de biologie moléculaire, des calicivirus humains (Hu CV virus de Norwalk et Small Round structured Virus) ont pu être identifiés dans des épidémies de gastro-entérites dont le vecteur était le coquillage. Un phénomène épidémique de gastro-entérites a été enregistré parmi les participants d'un congrès qui se déroulait du 3 au 5 mars 1997 à Poitiers (Vienne) et rassemblait 700 personnes environ, ainsi que parmi le personnel de service le 3 mars au soir. La période d'apparition des premiers symptômes et les signes cliniques ont orienté les soupçons vers les repas du 3 mars au soir et du 4 mars à midi. Le menu du 3 mars au soir comportait notamment des huîtres.

Nous présentons, dans l'article qui suit, les résultats de l'étude épidémiologique et des analyses microbiologiques réalisées sur les selles de malades et sur les coquillages soupçonnés d'être à l'origine de l'épidémie. Une investigation environnementale a été réalisée sur le secteur de stockage des coquillages incriminés afin d'analyser les causes probables de la contamination des coquillages.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Une enquête épidémiologique a été réalisée par les Services Vétérinaires (DSV) de Poitiers par l'envoi aux participants au congrès d'un questionnaire clinique et alimentaire utilisé habituellement pour l'investigation des épisodes de toxo-infections alimentaires collectives (TIAC). Soixante-dix-huit questionnaires ont été retournés à la DSV. La saisie et l'analyse des questionnaires ont été réalisées par le Réseau national de santé publique (RNSP). Un cas a été défini comme une personne ayant participé aux repas des 3 et 4 mars servis aux congressistes et ayant présenté un syndrome aigu gastro-intestinal entre le 3 et le 6 mars.

Les principaux aliments servis au cours des repas du 3 et du 4 mars ont fait l'objet d'analyses bactériologiques par les techniques normalisées de laboratoire (flore aérobie mésophile, coliformes totaux et thermotolérants, recherche de salmonelles, de *Bacillus cereus*, de *Staphylococcus aureus*). De plus, des recherches de toxines DSP (Diarrhetic Shellfish Poison) et de virus ont été réalisées dans les huîtres, respectivement à l'IDAC (Institut Départemental d'Analyse et de Conseil - Nantes) et au laboratoire de Microbiologie de l'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (IFREMER) de Nantes. Concernant les analyses virales, les principaux virus humains, entérovirus (EV), virus de l'hépatite A (VHA), calicivirus humains (Hu CV), rotavirus (RV) ont été recherchés par RT-PCR (retro-transcriptase polymérase chain reaction) et hybridation moléculaire.

Un prélèvement de selles a pu être obtenu de 4 malades le 5 mars. Ces prélèvements ont fait l'objet de recherches bactériologiques au laboratoire RièsGréjon de Jaunay Clan (Vienne), après inoculation sur milieu gélosé selon les techniques habituellement utilisées dans les laboratoires de biologie médicale. Les microorganismes suivants ont été recherchés: *Salmonella*, *Yersinia*, *E. coli* entéropathogènes, *Clostridium perfringens* et *staphylococcus aureus*. La présence de toxine de *clostridium perfringens* a été testée par le laboratoire de référence de l'Institut Pasteur (Paris). La recherche de virus (EV, VHA, RV, Hu CV) a été menée au laboratoire de Microbiologie de l'IFREMER. L'extraction des acides nucléiques viraux a été effectuée à l'aide d'un kit commercial (QIAamp viral RNA kit, qiagen); les techniques de RTPCR utilisées pour la détection de virus dans les selles de malades sont identiques à celles utilisées pour la détection de virus dans les coquillages.

Des huîtres suspectées à l'origine de l'épidémie (en provenance de concessions non découvrantes de la baie de Quiberon, Morbihan) ont été obtenues d'un ostréiculteur d'Oléron (Charente-Maritime). Le 11 mars, soit une semaine après l'événement, le même lot immergé dans une claire d'Oléron, a été de nouveau échantillonné, de même qu'un lot témoin d'huîtres de Marennes Oléron placées dans le même bassin. Des analyses virales (EV, VHA, Hu CV, RV) ont été réalisées sur ces coquillages par RT-PCR comme précisé précédemment.

RÉSULTATS

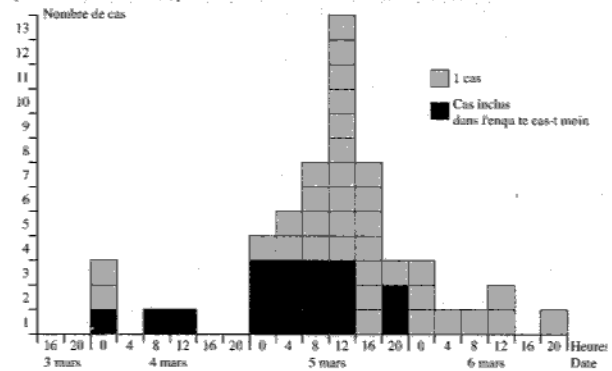
Enquête épidémiologique

L'enquête épidémiologique a été réalisée parmi les congressistes seulement. Sur les 700 participants au congrès, une centaine de personnes environ 120 selon les organisateurs, aurait développé des symptômes digestifs (taux d'attaque estimé à 17 %).

À partir des questionnaires retournés, 55 malades et 23 non-malades ont été identifiés. les symptômes des malades étaient caractérisés par la diarrhée (58 %), des vomissements (55 %), des douleurs abdominales (71 %), des nausées (65 %), une asthénie (62 %), des maux de tête (42 %), et de la fièvre (13 %). Deux malades ont présenté une diarrhée sanglante (4 %).

La médiane de la période d'incubation, calculée sur 52 observations, se situait à 38 heures avec un minimum de 4 heures et un maximum de 73 heures. La médiane de la durée des symptômes, établie à partir de 47 questionnaires cliniques, était fixée à 2 jours avec un minimum de 1 jour et un maximum de 30 jours. La courbe épidémique, réalisée sur 52 observations, suggérait une source commune et ponctuelle de contamination (figure 1).

Figure 1 : Épidémie de gastro-entérites virales, Poitiers, mars 1997. Courbe épidémique selon la date et l'heure de survenue des symptômes (intervalle 4 heures)



Parmi les 78 questionnaires recueillis, seuls 27 étaient exploitables pour

(1) IFREMER, Laboratoire de Microbiologie, Nantes.
 (2) Réseau national de Santé Publique, Saint-Maurice.
 (3) DSV Vienne.
 (4) IFREMER, Laboratoire côtier, La Trinité-sur-Mer.
 (5) DDASS Vienne.
 (6) DSV Morbihan.
 (7) DSV Charente-Maritime.
 (8) IFREMER, Laboratoire côtier, La Tremblade.

l'enquête alimentaire (17 malades et 10 non-malades) et ne permettaient d'évaluer que l'exposition à la consommation d'huîtres. Les 17 cas inclus dans l'analyse (figure 1) n'étaient pas cliniquement différents des 38 autres. La fréquence de consommation d'huîtres, lors du repas commun, était de 94 % (16/17) pour les ras et de 40 % (4/10) chez les témoins (odds ratio = 24, intervalle de confiance à 95 % : 2,2-260,3).

Analyses microbiologiques

Les analyses bactériologiques et toxiques réalisées dans les différents aliments servis n'ont pas mis en évidence de contamination. Par contre les analyses virales par RT-PCR et hybridation moléculaire ont montré que les huîtres servies au repas commun étaient positives pour les Hu CV. Parmi les 2 lots de coquillages prélevés le 11 mars chez le professionnel d'Oléron, seul le lot ayant la même origine que celui servi lors des repas communs était positif pour les Hu CV par RT-PCR et hybridation. Les huîtres du lot témoin étaient négatives.

Trois échantillons de selles parmi les 4 analysés étaient positifs pour les Hu CV par RT-PCR et hybridation ; deux prélèvements A et B possédaient la même souche virale, le prélèvement C présentait une souche différente. Une selle était positive pour un rotavirus du groupe A (selle D). Les résultats bactériologiques étaient négatifs.

Les fragments de Hu CV amplifiés par PCR, obtenus dans les échantillons d'huîtres et dans les 3 selles de malades ont été séquencés : une séquence identique (Hu CV1) a été mise en évidence dans les échantillons de coquillages et dans 2 selles de malades (A et B) parmi les 3 positives.

Enquête environnementale

Les huîtres consommées à Poitiers provenaient initialement de parcs en eaux profondes de la baie de Quiberon. Avant d'être expédiées vers Oléron le 27 février 1997, elles ont séjourné pendant 15 jours dans les bassins submersibles d'un établissement ostréicole, situé en amont de la rivière de Saint-Philibert (Morbihan). A leur arrivée à Oléron, elles n'ont pas subi de retrempe dans les eaux de ce secteur avant leur expédition vers Poitiers. Ces zones de production conchylicole sont des secteurs de bonne qualité bactériologique. Elles sont classées A pour les bivalves filtreurs non fouisseurs en fonction des normes de salubrité des coquillages destinés à la consommation humaine (directive 91/492/CEE, décret 94-340 du 28 avril 1994, arrêté ministériel du 21 juillet 1995, arrêté préfectoral du 12 juillet 1996). Les coquillages qui en sont issus ne nécessitent pas de traitement de purification.

De fortes pluies ont été enregistrées sur le secteur de la commune de Saint-Philibert les 24 et 25 février, correspondant à un record du siècle (60 mm d'eau en l'espace de 48 heures). Elles ont entraîné une augmentation des volumes d'eaux parasites dans le réseau d'assainissement, correctement dimensionné pour faire face aux fluctuations saisonnières de populations et aux phénomènes climatiques habituels sur le secteur, mais non aux phénomènes météorologiques exceptionnels. Lors de cet épisode pluvieux, une partie (environ 10 %) du volume transitant par le poste de relèvement principal qui collecte la totalité des eaux usées de la commune de Saint-Philibert, est passée au trop-plein. Ce volume, estimé à 280 m³, comprenait des eaux usées brutes diluées par l'apport exceptionnel d'eaux parasites, constituées par les eaux pluviales et les eaux de nappes. Ces eaux contaminées ont été rejetées en amont de la rivière de Saint-Philibert, près de l'établissement conchylicole où se trouvaient les huîtres. De plus, également à proximité de la zone de stockage des coquillages, débouche un important émissaire d'eau pluviale drainant une grande partie du bourg et recevant des eaux usées provenant de branchements non conformes.

DISCUSSION

L'enquête épidémiologique est incomplète et basée sur un petit nombre d'observations. Cependant, la symptomatologie et la durée d'incubation de la maladie observées chez les cas laissent supposer une étiologie virale. L'aspect de la courbe épidémique est en faveur d'une épidémie de source commune au cours du repas du 3 mars au soir. L'enquête alimentaire suggère une association forte avec la consommation d'huîtres. Cependant, celle-ci est basée sur un nombre limité de malades et de témoins ; de plus, aucune autre hypothèse alimentaire n'a été testée.

Les résultats virologiques renforcent l'hypothèse de l'étiologie virale de l'épidémie avancée précédemment puisqu'un Hu CV a été retrouvé dans les selles de 3 des 4 patients testés. Cette souche virale est le seul micro-organisme pathogène identifié dans les huîtres du repas témoin et la souche virale est identique chez 2 malades ainsi que dans le lot d'huîtres servies lors du repas du 3 mars. La convergence des informations cliniques épidémiologiques et virologiques conforte fortement l'hypothèse de l'implication de coquillages contaminés par une souche de Hu CV.

Les résultats des analyses virales effectuées sur les huîtres stockées chez l'ostréiculteur d'Oléron suggèrent que la contamination virale des coquillages est intervenue sur les lieux de production ou plus probablement sur la zone de stockage du littoral morbihannais. La zone de récolte était classée A pour les bivalves filtreurs en fonction des normes de salubrité des coquillages destinés à la consommation humaine. Cette classification est basée sur la concentration en conformes thermotolérants utilisés comme indicateurs de contamination fécale dont on sait qu'il n'est pas suffisamment sensible pour la contamination virale d'origine fécale humaine. La contamination virale des zones de production est probablement liée aux pluies exceptionnelles qui ont entraîné un débordement du réseau de collecte des eaux usées avec rejet direct dans l'environnement marin. Dans les rejets urbains bruts ou épurés, on retrouve divers micro-organismes, des coliformes thermotolérants, mais aussi des bactéries et des virus pathogènes. La présence de ces derniers est probablement liée à l'existence de cas sporadiques de malades ou d'épidémies dans la population.

Chaque hiver, une recrudescence des gastro-entérites, principalement d'étiologie virale, a lieu en France et dans les autres pays européens. Bien que le pic d'incidence survienne régulièrement en janvier, la responsabilité de la consommation de coquillages (les huîtres crues en particulier) dans la survenue de cette recrudescence n'a pas été confirmée lors d'une enquête cas témoin réalisée en 1996, soulignant ainsi la faible proportion des gastro-entérites attribuables à la consommation de coquillages au regard des autres modes de transmission en particulier interhumaine. Cependant, plusieurs épidémies collectives ou communautaires d'infections virales (Hu CV, hépatite virale) associées - ou suspectées de l'être - à la consommation de coquillages (huîtres ou palourdes) ont été rapportées en France ces dernières années. Ces épisodes épidémiques ont tous été observés pendant l'hiver entre décembre et mars et sont plutôt liés à une contamination fécale humaine en foyer d'une zone de production limitée, comme ce fut probablement le cas pour cette épidémie.

Comme cela a été rapporté dès le début des années 80 aux États-Unis, au Royaume-Uni et en Australie, cette étude souligne la fragilité des zones de production conchylicole classées A vis-à-vis d'une contamination virale des eaux littorales. Des recherches sont actuellement développées pour tester la validité de nouveaux indicateurs de pollution fécale, plus sensibles et rapides tels que les phages comme indicateurs de contamination virale. Dans les conditions actuelles, l'évaluation du risque viral associé à la consommation des coquillages nécessite une vigilance accrue et une coordination des différents acteurs (DDASS, RNSP, DSV et IFREMER).

2.7. Maladies d'origine alimentaire à agents transmissibles non conventionnels – La nouvelle variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob

Outre les bactéries, virus, parasites ou champignons, il existe d'autres agents de maladies transmissibles. Ils sont regroupés sous l'appellation : agents transmissibles non conventionnels (ATNC). Le plus important est le prion qui peut être considéré comme une protéine infectieuse.

Les **prions** sont responsables d'encéphalopathies spongiformes, maladies se caractérisant par la dégénérescence des neurones, rendant la masse cérébrale semblable à une éponge (les lésions sont appelées «spongioses»). Les principales formes sont :

- la «tremblante» du mouton ;
- l'encéphalopathie bovine spongiforme (ESB), encore appelée «maladie de la vache folle» ;
- chez l'Homme, la maladie de Creutzfeldt-Jakob sous sa forme traditionnelle et, plus récemment, sous sa nouvelle variante due au prion de l'ESB.

2.7.1. Physiopathologie des encéphalopathies spongiformes

Le mécanisme d'action des prions est aujourd'hui assez bien connu.

Les prions sont des protéines dont la séquence en acides aminés est identique à celle d'une protéine constitutive des neurones du système nerveux central (et sans doute des ganglions) : la protéine du prion (PRP). Ils diffèrent de cette protéine par leur conformation spatiale. Dans sa forme cellulaire normale, le prion est synthétisé par les neurones ; il aurait pour rôle de capter un signal à la surface des dendrites et de le transmettre vers le noyau du neurone. Sa structure spatiale comprend principalement des plis alpha. Les prions infectieux retrouvés dans les différentes encéphalopathies spongiformes transmissibles possèdent une structure spatiale comprenant des plis bêta, ce qui leur permet de résister à la destruction par le catabolisme et d'autocatalyser leur production. Ils s'accumulent donc dans le système nerveux et provoquent, de ce fait, la mort des neurones.

2.7.2. Les encéphalopathies spongiformes

Elles peuvent affecter l'Homme et les animaux. La «tremblante» du mouton est connue depuis le XVIII^e siècle. Chez l'Homme, la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) est connue depuis 1921. C'est une maladie relativement rare mais gravissime, se caractérisant par une spongiose cérébrale. L'âge moyen d'apparition est de 65 ans. En 2000, 767 suspicions ont été signalées, conduisant à 64 décès. Quelques cas de MCJ iatrogènes ont été démontrés, dus à l'injection d'hormones de croissance.

2.7.2.1. L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB)

Les premiers cas d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) ont été observés en 1985. Ils sont attribués à l'ingestion, par les animaux, de farines animales insuffisamment chauffées contenant le prion du mouton. Le prion responsable de la tremblante du mouton, transmis par l'alimentation, s'est adapté au système nerveux des bovins. Depuis, l'épidémie de la maladie de la vache folle a atteint des proportions importantes : 179 300 bovins atteints au Royaume-Uni, 453 au Portugal, 170 en France, 497 en Irlande, 364 en Suisse, selon les déclarations effectuées en Europe jusqu'au 1^{er} décembre 2000 (source : Office international des épizooties).

2.7.2.2. Sa transmission à l'Homme

La transmission à l'Homme a été admise en 1996, date de la découverte d'une nouvelle variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, maladie due à l'ESB. De 1996 à 2000, 90 cas de maladie de Creutzfeldt-Jakob nouveau variant (nv MCJ) ont été observés : 85 au Royaume-Uni, 2 en France et 3 en Irlande. La contamination humaine est d'origine alimentaire ; sont incriminés les organes et tissus bovins porteurs de l'agent de l'ESB, c'est-à-dire, très vraisemblablement, des produits contenant de la cervelle ou de la moelle épinière de bovins, puisque le prion se concentre dans le système nerveux central. Aucune recherche n'a pu mettre en évidence, jusqu'à présent, l'agent de l'ESB dans un muscle de bovin (c'est-à-dire dans la viande) ; l'infectiosité du lait semble totalement exclue.

2.7.3. Mesures réglementaires prises en France pour prévenir la maladie de Creutzfeldt-Jakob nouveau variant

2.7.3.1. Mesures concernant l'alimentation des animaux d'élevage

1989	Interdiction des farines animales britanniques dans l'alimentation des ruminants.
1990	Toutes les farines animales sont interdites pour l'alimentation des bovins.
1994	Toutes les farines animales sont interdites à tous les ruminants. Elles restent autorisées pour les porcs, les volailles et les poissons d'élevage.
1996	Interdiction d'incorporer des cadavres d'animaux et saisies d'abattoir dans les farines animales utilisées pour l'alimentation du porc, des volailles et des poissons d'élevage.
1996	Traitement obligatoire des farines animales avec un procédé inactivant le prion.
2000	Interdiction totale des farines animales.

2.7.3.2. Mesures prises au niveau du circuit de la viande

Abattage de la totalité des troupeaux au sein desquels un cas d'ESB a été découvert.

Surveillance « clinique » à l'abattoir afin d'empêcher l'entrée, dans le circuit de distribution, d'animaux présentant des symptômes susceptibles d'évoquer l'ESB.

Retrait et incinération des tissus et organes bovins potentiellement porteurs de l'ESB, dits MRS (matériel à risque spécifié) : crâne des bovins de plus de 6 mois, amygdales des bovins de plus de 12 mois, rate, thymus et intestins des bovins nés avant le 31 juillet 1991.

Un programme européen de dépistage des animaux porteurs du prion a été adopté (2000).

Animal	Test rapide	Test de référence	Carcasse	Abats à risque	Cuir	Troupeau
- de 30 mois	néant	néant	consommation humaine	destruction	valorisation	néant
+ de 30 mois	néant	néant	destruction, achat par l'État	destruction	destruction	néant
+ de 30 mois	néгатif	néant	consommation humaine	destruction	valorisation	néant
+ de 30 mois	positif	néгатif	destruction	destruction	destruction	néant
+ de 30 mois	positif	positif	destruction	destruction	destruction	abattage total

Tableau 7 – Test de diagnostic avant autorisation pour la consommation humaine des bovins français abattus âgés de plus de 30 mois

Tissu à risque	Matériel à risque spécifié au sens de la réglementation française
Crâne (y compris la cervelle et les yeux)	des bovins de + de 12 mois des ovins et caprins de + de 12 mois ou présentant une incisive permanente ayant percé la gencive des ovins et caprins nés ou élevés au Royaume-Uni quel que soit leur âge
Amygdales	des bovins quel que soit leur âge des ovins et caprins de + de 12 mois ou présentant une incisive permanente ayant percé la gencive
Moelle épinière	des bovins de + de 12 mois des ovins et caprins de + de 12 mois ou présentant une incisive permanente ayant percé la gencive
Rate	des bovins quel que soit leur âge des ovins et caprins quel que soit leur âge
Thymus	des bovins quel que soit leur âge des bovins suisses nés avant le 1er décembre 1991
Intestins entiers et graisse mésentérique	des bovins quel que soit leur âge
Tête entière, moelle épinière et viscères thoracique et abdominal	de tous les ovins et caprins qui seraient abattus dans le cadre de police sanitaire de la tremblante

Tableau 8 – Les MRS en France (11 novembre 2000)

3. Les éléments du diagnostic d'une toxi-infection alimentaire collective (TIAC)

Le diagnostic d'une TIAC passe par cinq étapes successives.

1 - Déterminer l'origine alimentaire d'une pathologie

Toutes les gastro-entérites ne sont pas d'origine alimentaire. Les gastro-entérites virales épidémiques sont fréquentes et représentent 50 % des diarrhées aiguës. D'autres, bactériennes, sont d'origine hydrique. Dans le cas de la consommation de fruits de mer, des algues du phytoplancton : les Dinoflagellées, peuvent être impliquées.

Devant un cas de gastro-entérite, il faudra donc mener une enquête dans l'entourage familial ou professionnel pour rechercher s'il existe des cas groupés pouvant être reliés à la prise d'un ou plusieurs repas en commun.

2 - Apprécier la date du repas suspect

La durée d'incubation est fonction du mécanisme physiopathologique. Les incubations les plus courtes sont le fait d'intoxications, la toxine ingérée agissant directement sur ses récepteurs.

Dans le cas d'un autre processus toxique, le délai d'apparition des troubles est plus long, il doit intégrer le temps de fixation des bactéries sur la membrane des entérocytes et le temps de production de la toxine.

La durée d'incubation la plus longue est observée pour les TIA dont le mécanisme est essentiellement invasif.

La prédominance des vomissements (*S. aureus*) et/ou l'absence de fièvre (*S. aureus*, *C. perfringens*) sont en faveur d'un processus toxique et orientent donc vers une incubation courte (2 à 12 h). Inversement, l'absence de vomissements, la fièvre sont en faveur d'une incubation longue (24 à 48 h).

3 - Identifier l'aliment responsable

On recherche, le plus souvent, un aliment commun à tous les malades.

4 - Orienter l'étiologie

Connaissant l'aliment responsable, en intégrant les signes cliniques et la durée d'incubation, on peut faire un pronostic sur l'agent infectieux en cause.

5 - Identifier l'agent pathogène par l'analyse microbiologique

L'analyse microbiologique est effectuée sur l'aliment suspect et sur les selles des malades. Une bactérie peut être mise en cause dans une TIAC lorsqu'un agent infectieux présentant les mêmes caractères morphologiques, biochimiques, antigéniques ou lysotypiques est isolé à la fois dans l'aliment suspect et dans les selles des malades.

Aliments \ Incubation	Incubation courte < 12 heures		Incubation longue
	Absence de fièvre		Fièvre
	Vomissements prédominants	Diarrhée prédominante	Diarrhée
Lait et dérivés	<i>Staphylococcus</i>	–	<i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Shigella</i> ¹ , <i>Yersinia</i>
Viandes, produits carnés	<i>Staphylococcus</i>	<i>C. perfringens</i> , <i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Shigella</i> ¹ , <i>Yersinia</i>
Fruits de mers, poissons	–	(Dinoflagellés)	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>Salmonella</i>
Légumes	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus</i>	–	<i>Yersinia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> ¹

(1) Contamination possible par porteurs de germes

Tableau 9 – Agents les plus fréquemment mis en cause en fonction des signes cliniques et du type d'aliment responsable (Document du Ministère chargé de la Famille et de la Santé)

4. Surveillance des TIAC (1)

4.1. Objectifs

La prévention et la maîtrise des infections passent par :

- l'identification précoce et le retrait de la commercialisation des aliments contaminés ;
- la correction des erreurs de préparation dans les établissements de restauration collective ou en milieu familial ;
- la connaissance des étiologies ;
- l'orientation des priorités en hygiène des aliments.

(1) D'après le document du Ministère chargé de la Santé et de la Famille : *Le praticien et les toxi-infections alimentaires collectives.*

Une synthèse annuelle des informations révèle les causes les plus fréquentes de toxi-infections. Cette évaluation permet d'orienter les actions de prévention et, si besoin est, de proposer de nouvelles mesures réglementaires en matière d'hygiène au niveau de l'industrie alimentaire ou de la restauration collective.

4.2. Moyens

Des analyses microbiologiques sont effectuées par :

- les directions des services vétérinaires (DSV)

Ces services sont responsables de la surveillance des produits alimentaires d'origine animale. Ils assurent aussi le contrôle des établissements de restauration collective en liaison avec les services d'hygiène des DDASS. Dans chaque département, les services vétérinaires disposent d'un laboratoire. Ils bénéficient des données concernant les autocontrôles effectués dans les établissements de préparation de plats cuisinés;

- les directions départementales des affaires sanitaires et sociales (DDASS)

Dans chaque DDASS, un médecin de santé publique étudie les problèmes épidémiologiques de son département. Il analyse les déclarations de maladie et répond aux demandes d'intervention.

D'autre part, les services d'hygiène du milieu effectuent régulièrement des contrôles des eaux destinées à l'alimentation, ils participent aux actions préventives menées dans le domaine de l'hygiène alimentaire;

- les directions de la consommation, de la concurrence et de la répression des fraudes

Ces directions sont responsables de la surveillance des produits d'origine non animale, assurent le contrôle de la qualité des aliments dans les circuits de commercialisation. Elles disposent de huit laboratoires interrégionaux et de laboratoires agréés.

Ces trois services, chacun dans leurs compétences, travaillent en coordination lors de l'investigation des toxi-infections alimentaires collectives.

4.3. Déclaration d'une toxi-infection alimentaire collective

Les TIAC font partie de la liste des maladies à déclaration obligatoire.

La déclaration se fait par l'intermédiaire d'un questionnaire (fig. 9) anonyme qui est adressé au médecin de la DDASS du département.

L'ensemble des informations recueillies est analysé aux niveaux départemental et national, une synthèse annuelle est diffusée dans le *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*.

Caractéristiques du/des malades					
Initiales	Âge	Sexe	Code postal du domicile	Date et heure du début des signes cliniques	Hospitalisation
<p>DESCRIPTION CLINIQUE : Nombre de personnes ayant présenté</p> <ul style="list-style-type: none"> - des nausées : _____ - des vomissements : _____ - de la diarrhée : _____ - de la fièvre (> 38°) : _____ - des douleurs abdominales : _____ - d'autres signes (préciser) : _____ Complications (préciser) : _____					
<p>ANALYSES MICROBIOLOGIQUES : Chez les malades : _____ Dans les aliments : _____</p>					
<p>ORIGINE DE L'INTOXICATION : Date et heure du repas : _____</p> <p>Lieu du repas : - repas familial <input type="checkbox"/> - restaurant <input type="checkbox"/> - collectivité <input type="checkbox"/> - scolaire <input type="checkbox"/> - restaurant d'entreprise... <input type="checkbox"/> - autre (préciser) <input type="checkbox"/></p> <p>Aliment(s) suspecté(s) : _____ Origine : _____</p>					

Fig. 12 – Questionnaire de déclaration de TIAC

CHAPITRE V

PARASIToses D'ORIGINE ALIMENTAIRE

Les aliments peuvent être le véhicule de formes infestantes de parasites : œufs, larves, formes adultes de vers, kystes et formes végétatives d'amibes. Sous nos climats sont particulièrement concernés les plathelminthes (vers plats) ainsi que certains protozoaires : toxoplasmes, amibes.

1. Helminthiases d'origine alimentaire

Rappelons schématiquement les critères de base de classification des vers parasites (Helminthes) :

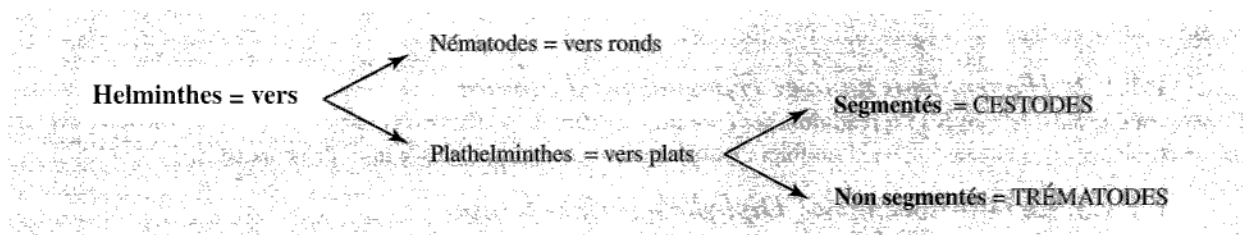


Fig. 1 – Classification simplifiée des vers parasites

1.1. Cestodoses d'origine alimentaire

La plupart des cestodoses sont dues, sous nos climats, à des ténias. Ces parasitoses sont appelées téniasis.

1.1.1. Ténias retrouvés chez l'homme sous la forme adulte

1.1.1.1. *Taenia solium* et *Taenia saginata*

• Morphologie

Ces parasites peuvent atteindre huit mètres de long.

Ils sont constitués :

- d'une tête (ou scolex), comprenant elle-même :
 - un rostre pourvu de crochets,
 - des ventouses;
- d'un corps en forme de ruban divisé en anneaux.

Les premiers anneaux sont courts et plus larges que longs, les derniers sont trois fois plus longs que larges. Un ver solitaire peut compter jusqu'à 2000 anneaux.

• Cycle évolutif

Les ténias sont des organismes hermaphrodites. Les premiers anneaux, musculieux, sont mâles, les anneaux qui suivent sont femelles. La fécondation

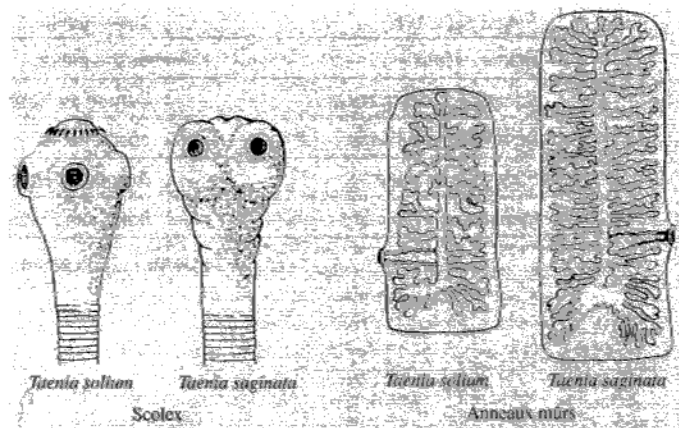


Fig. 2 – Morphologie de *T. solium* et *T. saginata*

se fait d'anneaux mâles à anneaux femelles et aboutit à la production d'œufs. Les anneaux « mûrs » se séparent du corps du ver (tandis que de nouveaux anneaux sont produits sous le scolex) et sont éliminés avec les selles dans le milieu extérieur où ils libèrent leurs œufs. Ceux-ci sont absorbés par des hôtes intermédiaires chez lesquels ils évoluent pour donner des formes larvaires.

Les formes larvaires sont généralement des cysticerques. L'embryon, libéré par digestion de l'œuf dans le tube digestif de l'hôte intermédiaire, passe dans la circulation et s'installe dans un tissu. Il se forme alors, dans la masse de l'embryon, une vésicule; l'ensemble porte le nom de cysticerque.

Des cysticerques à *Taenia solium* peuvent être trouvés dans les masséters et dans la langue de porc, hôte intermédiaire habituel de ce ver. L'incision des masséters permet un diagnostic rapide dès l'abattage. Les cysticerques de *Taenia saginata* donnent chez le bœuf des kystes plus petits et plus difficiles à dépister.

La forme adulte apparaît chez l'homme après absorption de cysticerques. C'est le classique ver solitaire.

• Principales manifestations chez l'homme

La présence de formes adultes de *T. solium* ou *T. saginata* est, chez l'homme, à l'origine :

- de troubles digestifs : diarrhées ou constipation, douleurs abdominales épigastriques ;
- d'une asthénie plus ou moins marquée ;
- de boulimie, vertiges, parfois d'anorexie ;
- d'hyperéosinophilie.

La cysticerose de l'homme se manifeste, selon la localisation de la larve, par des douleurs musculaires, des troubles nerveux ou des troubles oculaires.

1.1.1.2. *Hymenolepis nana* et *Hymenolepis diminuta*

Ils peuvent être aussi retrouvés à l'état adulte chez l'homme. Ce sont de petits ténias dont l'absorption accidentelle avec un ver de farine peut conduire à différents troubles digestifs et nerveux groupés sous le nom de tœniasisme.

1.1.1.3. Le bothriocéphale : *Diphyllobothrium latum*

C'est un parasite de l'homme et de différents animaux (chien, chat, porc...). Le bothriocéphale est un ver plat segmenté de deux à huit mètres de long. Son cycle évolutif comprend deux hôtes intermédiaires. Les œufs évoluent chez un petit crustacé (cyclop) en une première larve (larve procercoïde). Cette dernière est ingérée par des poissons où elle se transforme en une deuxième forme larvaire (larve plérocercœide). La contamination de l'homme se fait par absorption de chair de poisson insuffisamment cuite. La larve plérocercœide évolue dans l'organisme humain sous la forme adulte. Les œufs apparaissent dans les selles cinq à six semaines après l'infestation.

Outre les signes du tœniasis décrits précédemment (voir § 1.1.1. *T. solium* et *T. saginata*), le bothriocéphale peut provoquer une anémie mégalocytaire (= avec augmentation de la taille des hématies).

Le diagnostic est posé par l'examen des anneaux éliminés par le malade (aspect en « nouilles ») et l'examen coprologique, l'aspect des œufs étant très caractéristique de l'espèce.

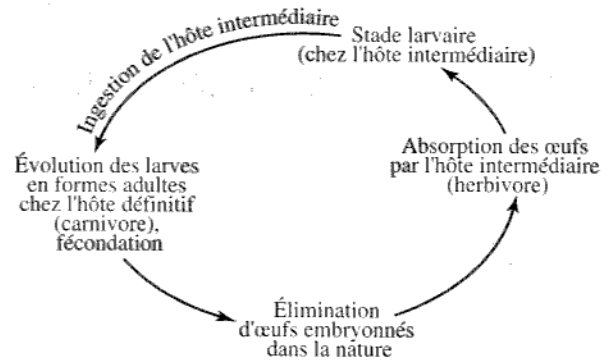


Fig. 3 – Cycle évolutif de *T. solium* et *T. saginata*

Ténia	Répartition géographique	Longueur
<i>Taenia saginata</i>	cosmopolite	6 - 8 m
<i>Taenia solium</i>	cosmopolite	6 - 8 m
<i>Diphyllobothrium latum</i>	Europe du Nord	2 - 10 m
<i>Diphylidium caninum</i>	cosmopolite	0,15 - 0,40 m
<i>Hymenolepis nana</i>	Afrique du Nord	0,10 - 0,25 m
<i>Hymenolepis diminuta</i>	Italie, Amérique du Sud	0,30 - 0,70 m

Tableau 1 – Les principaux ténias

ENQUÊTE SUR L'INCIDENCE DE LA BOTHRIOCEPHALOSE EN HAUTE-SAVOIE (1993-2000)

Laurent Désvois¹, Alain Gregory², Thierry Ancelle¹ et Jean Dupuy-Camet¹

La bothriocéphalose est une parasitose intestinale provoquée par l'ingestion de poisson cru contenant des larves infestées d'un ver cestode *Diphyllobothrium latum*. Le bothriocéphale est le plus grand des parasites humains puisqu'il peut atteindre une dizaine de mètres. Il provoque des manifestations digestives (douleurs abdominales, troubles du transit) et a été rendu responsable en cas d'infestations multiples et prolongées d'une carence, en vitamine B12 (1). Cette parasitose était considérée comme disparue de France, et plus généralement des régions alpines d'Europe, anciens foyers historiques. Cependant, dès 1990, Peduzzi rapportant 18 cas, signalait la résurgence de cette parasitose sur les rives suisses du lac Majeur (2) Golay et Mariaux identifiaient, entre 1980 et 1994, 73 cas suisses dont la majorité était imputable à la consommation de poissons du lac Léman (3). Enfin, en 1996, l'un d'entre nous diagnostiquait 2 cas à St-Julien-en-Genevois (4). Cette étude a pour objectif de préciser l'incidence réelle de cette parasitose en Haute-Savoie, département riverain du lac Léman qui comptait en 1999 une population de 631 000 habitants. Une enquête a donc été réalisée auprès de tous les laboratoires d'analyses de biologie médicale de ce département.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

L'ensemble des 50 laboratoires (42 privés et 8 publics) du département, identifiés par un annuaire professionnel, a reçu un questionnaire leur demandant d'indiquer le nombre de cas de bothriocéphalose diagnostiqués entre le 1^{er} janvier 1993 et le 31 décembre 2000. Un cas a été défini comme un sujet présentant des œufs à l'examen parasitologique des selles ou ayant émis spontanément des anneaux. En cas de réponse positive, il était demandé au laboratoire de préciser le mode diagnostic, la localité d'origine du cas, et le nom du médecin traitant. Les médecins traitants étaient alors contactés directement pour préciser le mode de contamination, les signes cliniques, les examens complémentaires effectués, le traitement prescrit et son efficacité. Les patients qui ont pu être identifiés, ont été interrogés directement, après accord obtenu par l'intermédiaire du médecin traitant. Une estimation du coût de la prise en charge de ces patients a été effectuée en additionnant le coût des diverses consultations, examens complémentaires et traitements.

En cas de non-réponse écrite au questionnaire d'un laboratoire, le biologiste responsable de celui-ci était contacté directement par téléphone.

La comparaison statistique des nombres de cas annuels observés a été effectuée par la loi de Poisson.

RÉSULTATS

Tous les laboratoires ont répondu à l'enquête. Sur la période considérée, 22 cas de bothriocéphalose ont été identifiés. Le mode diagnostic est connu pour 13 cas : présence des seuls anneaux caractéristiques pour 6 cas, présence d'œufs seuls pour 3 cas, présence des anneaux et des œufs pour 4 cas. La répartition des cas dans le temps (figure 1) montre une incidence moyenne de 2,75 cas par an, avec un pic significatif de 7 cas en 1998 ($p < 0,02$). Vingt des 22 cas ont été rapportés par des laboratoires situés sur les bords du lac Léman. Un cas a été rapporté par un laboratoire, de Meythet (près d'Annecy) et un autre à Cluses (figure 2).

Des précisions cliniques et épidémiologiques, n'ont pu être obtenues que pour 9 cas (tableau I). Le cas de Meythet était secondaire à l'ingestion de poisson cru pêché par le patient lui-même en Suisse ou dans des petits lacs des environs. Un autre cas était très certainement importé car aucune consommation de poissons crus du lac n'a pu être retrouvée mais le patient avait consommé de l'esturgeon, du saumon, et d'autres poissons crus, 4 semaines auparavant lors d'un voyage en Biélorussie. Les poissons suspectés, pour 5 des 7 autres

cas, étaient toujours originaires du Léman : filets de perche crus (*Perca fluviatilis*) ombles chevaliers (*salvelinus alpinus*) peu cuits, carpaccio de poissons du lac.

Figure 1. Nombre annuel de cas de bothriocéphalose observés en Haute-Savoie (1993-2000)

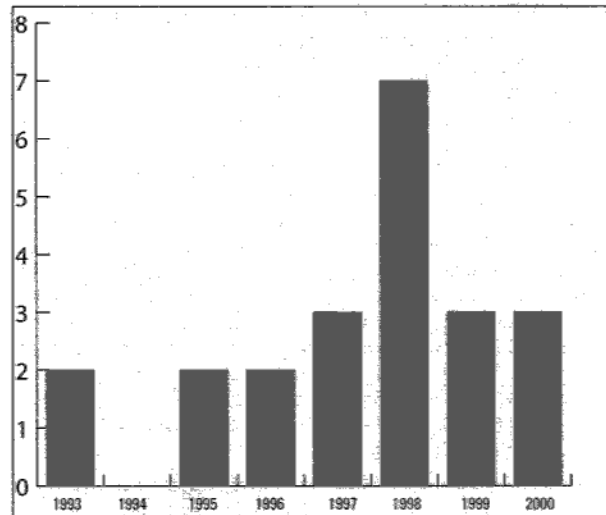


Figure 2. Répartition géographique des cas de bothriocéphalose identifiés en Haute-Savoie (1993-2000)



Enfin, dans deux cas, le repas contaminant n'était pas établi avec précision, mais il s'agissait respectivement d'une employée de poissonnerie et d'une employée de restaurant. Au total, parmi les 7 cas autochtones, 4 cas peuvent être rattachés à une consommation au restaurant, deux cas à une poissonnerie (une employée, un client), et un cas à la pêche locale.

D'un point de vue clinique, la parasitose se manifeste par de la diarrhée et des douleurs abdominales parfois intenses ayant motivé dans 2 cas sur 9 une coloscopie, dans un cas une fibroscopie gastrique, et dans un cas une échographie hépatique. Une hyperéosinophilie (11 à 17 %) est notée dans 4 cas sur 5. Il n'est pas signalé d'anémie.

Une analyse détaillée de 8 huit dossiers a permis d'inventorier le nombre de consultations (24 dont 5 spécialisées), d'examens complémentaires (2 colonoscopies, 1 échographie abdominale, une fibroscopie gastrique, 13 examens parasitologiques des selles, 5 numérations sanguines) et de traitements (8 traitements par niclosamide, un traitement par praziquantel). Cette analyse a permis de chiffrer le prix moyen de la prise en charge médicale à 395 € par patient.

(1) Laboratoire de parasitologie-Mycologie CHU cochin 27 rue du Faubourg St Jacques 75014 Paris

(2) Laboratoire de Biologie, hôpital intercommunal sud léman-valserine 74164 St Julien-en-Genevois

DISCUSSION

Cette enquête rétrospective permet une évaluation de l'incidence de la bothriocéphalose en Haute-Savoie. Des informations cliniques et épidémiologiques n'ont pu être obtenues que dans 9 cas sur 22. En effet, les laboratoires ne disposaient pas obligatoirement du nom du prescripteur ou s'ils se souvenaient du cas observé, n'ont pas été à même de retrouver le nom du patient.

Néanmoins, cette étude montre que cette parasitose sévit sur les rives du lac Léman, mais semble absente des rives de celui d'Annecy. Deux à trois cas sont diagnostiqués chaque année par les laboratoires, à l'exception du pic de 7 cas observé en 1998. Notre enquête n'est certainement pas exhaustive, et quelques cas peuvent avoir été traités directement par niclosamide par leur médecin traitant, soit pour bothriocéphalose, soit pour téniasis à *Taenia saginata*, compte tenu de la relative similitude des anneaux de ce vers avec ceux du bothriocéphale. La symptomatologie digestive observée parmi les patients est parfois marquée, mais la classique anémie macrocytaire n'a pas été signalée par les différents laboratoires. Le diagnostic de la bothriocéphalose repose sur l'émission de chaînes d'anneaux caractéristiques (plus larges que hauts) et la présence d'œufs dans les selles. Les œufs de bothriocéphale, bien qu'ils soient deux fois plus petits, sont parfois confondus avec ceux de *Fasciola hepatica*, comme cela a été le cas, dans un premier temps, pour une de nos observations. La bothriocéphalose est liée à la consommation de poisson cru ou peu cuit (perche, omble chevalier) contenant des larves infestantes dites plérocercoides, mais il n'existe pas d'enquête vétérinaire étudiant l'infestation des poissons du lac Léman. Dans les lacs suisses voisins de Sienné et de Morai, 3,7 à 5,2 % des perches et 12 à 14 % des brochets sont parasités par une larve plérocercoides (3).

Bien qu'il n'existe aucune référence chiffrée, il semble que cette parasitose soit réapparue récemment. En effet, les laboratoires indiquent que, dans les années précédant notre enquête, seuls de rares cas sporadiques étaient diagnostiqués. Ces rares cas humains, ainsi que l'éventuelle présence d'un cycle animal (chat, renards, chien...) sur les pourtours du lac, pourraient avoir permis le maintien d'un parasite extrêmement prolifique : la ponte est de plusieurs millions d'œufs par jour chez l'homme (5). La présence de stations d'épuration n'est pas un facteur suffisant pour interrompre le cycle, dans la mesure où elles n'épurent au mieux que 95 % à 99 % des œufs (5), et que des débordements d'eaux usées dans le lac sont possibles en cas de fortes pluies. Par ailleurs, l'amélioration de la qualité des eaux du lac Léman a entraîné ces dernières années une augmentation des tonnages de poissons pêchés et de la consommation locale (environ 500 tonnes pêchées en 1999 contre 64 en 1979). En outre, de nouvelles habitudes culinaires, amenant à consommer le poisson cru ou peu cuit, ont probablement favorisé la recrudescence de la bothriocéphalose. D'autre part, les laboratoires d'analyses médicales ont pu être sensibilisés à ce diagnostic par le Contrôle National de Qualité en Parasitologie, qui a proposé en 1995 et 1997 des selles contenant des œufs de bothriocéphale (6).

Peut-on invoquer, pour expliquer le pic de 1998, des précipitations élevées ou des prises de poissons plus nombreuses ? Les précipitations, observées dans une station météorologique proche, sont en déficit d'environ 30 % pour 1997 et 1998 par rapport aux années précédentes. Les conséquences de pluies torrentielles souillant le lac, sur un

cycle parasitaire complexe, pourraient ne se manifester qu'avec une certaine latence. Les tonnages d'ombles chevalier pêchés sur la rive française par les professionnels, entre 1993 et 1998, ont été stables aux alentours de 20 tonnes. En revanche, pour la perche, après 4 années avec des tonnages oscillant de 40 à 60 tonnes, 1998 a été marqué par une augmentation considérable du tonnage à 144 tonnes (source : Direction Départementale de l'Agriculture et de la Forêt). Mais, en 1999, les tonnages de perches étaient équivalents alors que seuls 3 cas de bothriocéphalose ont été répertoriés cette année-là. Les milieux de la pêche semblent avoir été informés de cette recrudescence, à cette époque, ce qui pourrait expliquer la relative stagnation après le pic constaté en 1998. De plus, des travaux importants (création de bassins d'orage) ont été réalisés en 1998 (ou sont encore en cours), sur les deux principales stations de la côte française, permettant ainsi d'éviter les rejets intempestifs d'eaux usées non traitées. Cependant, ces stations d'épuration n'empêcheront pas une éventuelle pollution fécale du lac par les très nombreux plaisanciers qui y naviguent.

En conclusion, il est souhaitable de compléter cette enquête par des enquêtes vétérinaires chez les poissons du lac et les carnivores domestiques ou sauvages riverains. Ce type d'enquête pourrait être répété pour suivre l'évolution de la parasitose et devrait être étendu à d'autres régions de lac (par exemple lac du Bourget). D'une façon générale, il est nécessaire d'informer les consommateurs des risques liés à la consommation de poissons du Léman crus. La cuisson à 55 °C tue les larves plérocercoides en 5 minutes ; la congélation à -10 °C tue la larve en 8 à 72 heures selon l'épaisseur du poisson (7). Les très nombreux restaurants qui proposent dans leurs menus des mets à risques (poissons marinés, carpaccio...) pourraient également appliquer ces mesures de prophylaxie.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les 50 laboratoires de Haute-Savoie, les techniciens des stations d'épuration, Mrs Gerdeux et Balvay du Centre d'Équilibre du Lac Léman (Thonon-les-Bains) et M^{me} Michoud (Direction Départementale de l'Agriculture et de la Forêt Thonon les Bains) pour leur contribution à cette enquête.

RÉFÉRENCES

[1] BOURÉE P. cestodoses adultes, Éditions Techniques-Encycl.Méd.Chir. Paris France. Maladies Infectieuses, 1995, 8-510-A-10, 14 p.
 [2] PENDUZZI R. Résurgence de la bothriocéphalose (parasitose à *Diphyllobothrium latum* dans la région du lac Majeur. Médecine et Maladies Infectieuses, 1990, 20 : 493-497
 [3] GOLAY M, MARIAUX J. Situation de *Diphyllobothrium latum* L., 1758, dans quatre lacs du plateau suisse. Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles, 1995, 118 : 79-86.
 [4] GREGORY A., GARDIEN E, FASSIER N.-P. Bothriocéphalose (parasitose à *Diphyllobothrium latum*) étude de deux cas. Feuilles de Biologie, 1998, 39 : 65-67.
 [5] BONSORRFF VON B., BYLUND G. The Ecology of *Diphyllobothrium latum* Ecology of disease 1982, 1 (1) : 21-27
 [6] PETITHORY JC. Diagnostic biologique de *Diphyllobothrium latum* Annales du Contrôle national de qualité 1998, 15, 19-21.
 [7] BONSORRFF VON B. *Diphyllobothriasis in man*. Academic Press, Londres, 1977, 189 pp.

Tableau 1. Caractéristiques des 9 patients pour lesquels des données cliniques et épidémiologiques ont pu être obtenues (NFS : numération formule sanguine ; EPS : examen parasitologique des Selles). Le patient 9 n'a pas été inclus dans l'analyse des coûts.

Patient	Âge	Sexe	Année	Localité	Mode de contamination	Poisson suspecté	Critère de diagnostic	Clinique	Explorations diverses
1	50	M	2000	Gaillard	restaurant en Biélorussie	esturgeon, saumon et autres poissons crus	Œufs et vers	diarrhée	NFS, 2 EPS
2	58	M	2000	Évian	restaurant et achat à des pêcheurs	filets de perche crus	vers	douleurs abdominales	NFS, 2 EPS, coloscopie, fibroscopie
3	66	F	1999	Cluses	poissonnerie	omble chevalier peu cuit	Œufs et vers	douleurs abdominales, diarrhée	4 EPS
4	47	F	1995	Thonon	restaurant	carpaccio de poissons du Léman	Œufs	douleurs abdominales, diarrhée	NFS, 2 EPS, coloscopie, échographie foie
5	50	M	1995	Thonon	restaurant	carpaccio de poissons du Léman	Œufs	douleurs abdominales, diarrhée	NFS, EPS
6	61	M	2000	Thonon	achat à des pêcheurs amateurs	omble chevalier peu cuit	vers émis	douleurs abdominales, diarrhée	non
7	26	F	1996	St Julien-en-Genevois	Employée de restaurant	?	Œufs et vers	douleurs abdominales, boulimie	EPS
8	21	F	1996	St Julien-en-Genevois	Employée de poissonnerie	?	vers	douleurs abdominales, diarrhée, amaigrissement	NFS, EPS, dosage vit. B12
9	?	M	1998	Meythet	Pêcheur amateur en Suisse	?	Œufs et vers	douleurs abdominales	EPS

1.1.2. Ténias présents chez l'homme sous forme larvaire

1.1.2.1. *Echinococcus multilocularis*: l'échinococcose alvéolaire

• Épidémiologie

L'échinococcose alvéolaire est une parasitose due à la larve d'un ténia: *Echinococcus multilocularis*. À l'état adulte, ce ver vit dans l'intestin de ses hôtes définitifs: renard roux essentiellement, mais aussi, moins fréquemment, chiens et chats.

Les œufs éliminés avec les excréments des hôtes définitifs sont absorbés par des hôtes intermédiaires: petits rongeurs (campagnols pour la plupart), chez lesquels ils se transforment en une larve qui détruit progressivement leur foie. Le cycle est bouclé par la prédation des campagnols par les renards.

L'homme est un hôte intermédiaire accidentel. Il peut s'infester de façon directe, en touchant ou dépeçant des renards.

Cependant, la consommation de baies sauvages et de pissenlits apparaît comme un facteur de risque majeur (85 % des cas) ainsi que la consommation de légumes provenant d'un potager non clos accessible aux renards et aux chiens.

• Aspects cliniques

L'incubation est longue (dix ans environ), la maladie se manifeste alors par des douleurs abdominales, une atteinte hépatique: ictère ou hépatomégalie d'aspect tumoral. L'évolution n'est presque jamais favorable.

• Prévalence

Elle est faible: 235 cas ont été recensés en France entre 1931 et 1983, essentiellement dans l'Est (Lorraine, Franche-Comté, Haute-Savoie). Sur le continent américain, les foyers les plus importants sont en Alaska et au nord du Canada. Depuis 1970, le nombre moyen de cas est de 4 avec des variations annuelles importantes (aucun cas en 1974, 9 cas en 1979).



Fig. 4 – L'échinococcose alvéolaire

1.1.2.2. *Echinococcus granulosus*: le kyste hydatique (voir document 2)

Le kyste hydatique est dû au développement chez l'homme de la forme larvaire (hydatide) d'un ténia du chien: *Echinococcus granulosus*. C'est un très petit cestode mesurant cinq à huit millimètres de long et très commun (en grand nombre) dans l'intestin grêle du chien. Les œufs sont éliminés avec les selles dans le milieu extérieur et sont absorbés par un hôte intermédiaire herbivore, par ordre de fréquence: le mouton, les bovins, le cheval, le porc... l'homme. L'embryon est libéré dans le tube digestif, traverse la paroi digestive et parvient au foie par voie sanguine. Sept fois sur dix, sa progression sera arrêtée à ce stade. Sinon, dépassant le foie par les veines sus-hépatiques, il passe par le cœur droit et parvient au poumon où il est fixé. Plus rarement, par l'intermédiaire de la circulation générale, la localisation se fait en un point quelconque de l'organisme. L'embryon se transforme alors en hydatide ou kyste hydatique dont la croissance est lente.

Un kyste hydatique contient des milliers de scolex. Sa rupture peut donc aboutir à en former de nouveaux en grand nombre; l'évolution peut alors être mortelle.

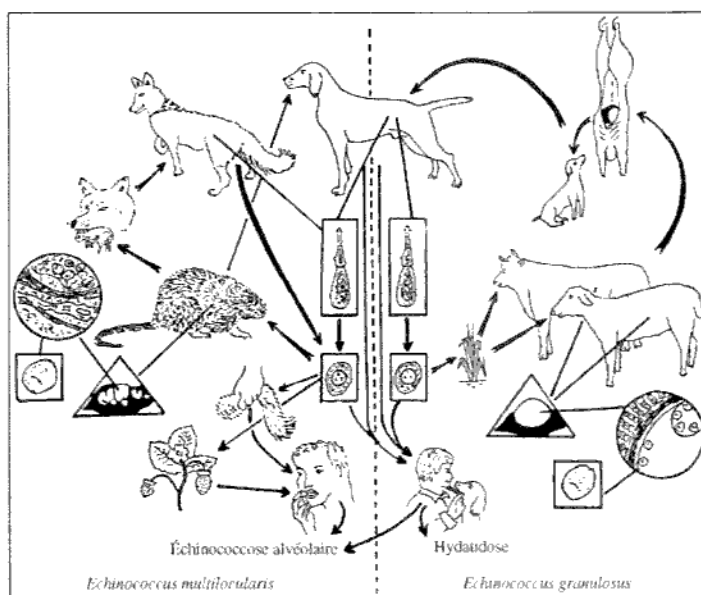


Fig. 5 – Cycles comparés d'*Echinococcus multilocularis* et *Echinococcus granulosus*

Noter que les deux cestodes peuvent passer par le chien
(Source: *Le journal du jeune praticien* n°154)

L'HYDATIDOSE EN FRANCE EN 1987

A. GHOUBONTNI, F. GAY, G. BROUSSE
(Centre national de référence pour les maladies d'importation)

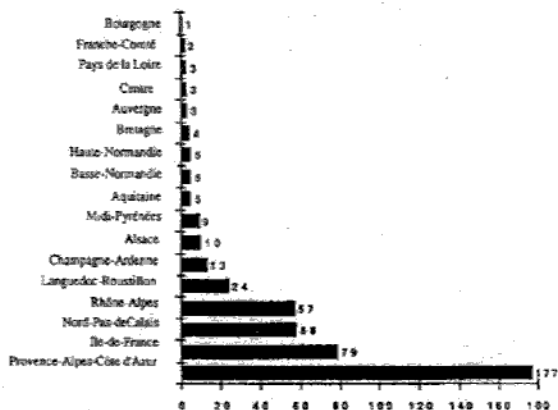
1. PRÉVALENCE ET INCIDENCE

En 1987, 33 laboratoires hospitaliers en majorité des C.H.R./C.H.U. nous ont signalé 464 cas d'hydatidose et nous disposons d'une fiche individuelle de renseignements pour 438 cas. 26 cas nous ont été signalés comme étant des sérologies hydatidiques positives. Parmi les 464 cas, 355 (76,5 %) sont diagnostiqués pour la première fois, 45 (9,7 %) sont des rechutes. Pour les 64 (13,8 %) autres cas nous n'avons pas de renseignements. Ces données nous permettent d'estimer la prévalence de l'hydatidose en France à environ 500 cas et l'incidence annuelle à environ 400 cas, pour 1987.

2. PRÉVALENCE PAR RÉGION (fig. 1)

La Provence - Côte d'Azur enregistre le nombre le plus élevé de cas : 177 (soit 38 % du total).

Figure 1. - Prévalence de l'hydatidose par région en 1987 (total : 464 cas)



Les autres régions où l'on note de fortes prévalences sont : l'Île-de-France (79-cas = 17 %), le Nord - Pas-de-Calais (58 cas = 12,5 %), et la région Rhône Alpes (57 cas = 12,5 %).

Cette différence de prévalence peut s'expliquer par la présence de foyers autochtones actifs : (Sud-Est), mais aussi par l'existence d'infrastructures hospitalières (laboratoires d'analyse; services de radio-diagnostic et unité de chirurgie) pour la prise en charge de ce type de malades; et surtout par la forte implantation de population migrante originaire du Maghreb dans certaines régions.

3. CARACTÉRISTIQUES DÉMOGRAPHIQUES

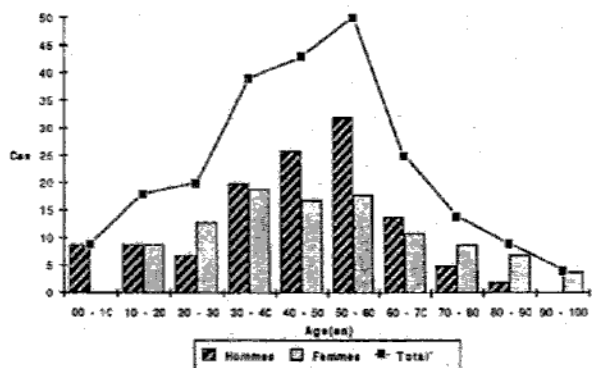
a. Âge et sexe (fig. 2)

L'échantillon est composé de 57 % d'hommes et de 43 % de femmes; le sexe ratio est de 1,3. La distribution en fonction de l'âge montre une prédominance des adultes d'âge mûr, en effet 152/231 soit 66 % des sujets ont entre 20 et 60 ans, avec un pic de fréquence à 50-60 ans (22 % des sujets).

Les enfants (moins de 15 ans), sont au nombre de 15 et représentent donc 6,5 % du total.

L'âge moyen est de 47 ans, celui des femmes (55 ans) est supérieur à celui des hommes (48 ans) p < 0,0001.

Figure 2. - Hydatidose, répartition par âge et sexe en 1987



b. Répartition selon la nationalité

Les sujets de nationalité étrangère représentent 59 %, la majorité d'entre eux sont originaires du Maghreb (49 %), les Européens du Sud (Italie, Espagne et Portugal) représentent 7 % et les Français 41 % de l'échantillon.

4. ORIGINE GÉOGRAPHIQUE DE L'INFESTATION

L'hydatidose en France est surtout une pathologie d'importation, 171/264 (65 %) des cas sont importés, 80 % des cas importés (135 cas) proviennent des 3 pays du Maghreb, 26 cas soit 15 % de cas de l'Europe du Sud (Italie, Espagne, Portugal).

L'hydatidose autochtone avec 93 cas représente, en 1987, 35 % du total. 55 cas soit 60 % proviennent du Sud-Est et 24 (26 %) de Corse.

Enfin on note des cas provenant de régions non endémiques (3 cas du Nord-Ouest, 2 cas du Centre).

5. DESCRIPTION CLINIQUE

a. La localisation kystique (tabl. 1)

La localisation kystique intéresse surtout le foie, qui est l'organe le plus touché (76 % des cas); son atteinte est plutôt isolée (93 % des cas) et se voit dans les primo-infestations (89 % des cas). L'autre organe souvent atteint est le poulmon (15 % des cas).

Des viscères tels que la rate semblent être le siège de kystes aussi bien dans les primo-infestations que lors des rechutes (50 %); l'atteinte splénique est souvent associée à celle d'un autre organe (75 % des cas).

Tableau 1

	Foie	Poulmon	Rate	Péritoine
Atteinte multiple	76	15	2	2
Atteinte isolée	93	82,5	25	0
Atteinte lors des primo-infestations	89	88	60	28

L'atteinte péritonéale est toujours (100 %) associée à celle d'un autre organe et se voit surtout lors des rechutes (75 % des cas).

Dans les primo-infestations l'atteinte intéresse plutôt un seul organe (96 % des cas); en revanche, dans les rechutes, la localisation kystique concerne 2 ou plusieurs organes (72 % des cas).

Les localisations multiples se voient chez les sujets de plus de 50 ans, et interresse dans 63 % des cas des sujets non européens, essentiellement des Maghrébins (47 %).

Aucune localisation multiple n'a été signalée chez les enfants.

b. La sérologie

Elle est positive dans 90 % des primo-infestations; et dans 92 % des primo-infestations avec localisations multiples.

c. Le traitement

Le traitement de choix reste la chirurgie (82 % des cas); 3 % des cas ont bénéficié d'un traitement médical et dans 14 % des cas l'indication chirurgicale a été différée ou refusée.

CONCLUSION

La persistance de foyers autochtones actifs en France devrait inciter à améliorer le dépistage des malades porteurs de kystes (sérologie, échographie), à concentrer dans ces régions les actions de prévention du kyste hydatidique, par le traitement systématique des chiens, l'incinération des viscères infectés et par le contrôle des abattages « clandestins » dans certaines communautés.

1.2. Distomatoses

Les distomatoses sont des affections dues aux douves, vers plats non segmentés, d'aspect foliacé, de taille variable (quelques millimètres à quelques centimètres), hématophages, fixés par des ventouses sur différents organes de leur hôte : tube digestif, canaux biliaires, bronchioles.

1.2.1. Cycle évolutif des douves

Les douves adultes pondent des œufs qui sont éliminés par les selles ou les expectorations. Au contact de l'eau, le petit embryon cilié contenu dans l'œuf est libéré et nage à la rencontre d'un mollusque (différent pour chaque douve). Chez le mollusque se développent des formes larvaires qui s'enkystent sur des végétaux aquatiques (voir document 3) ou gagnent un deuxième hôte intermédiaire: poisson ou crustacé. C'est en ingérant ces poissons ou crustacés mal cuits que l'homme se contamine.

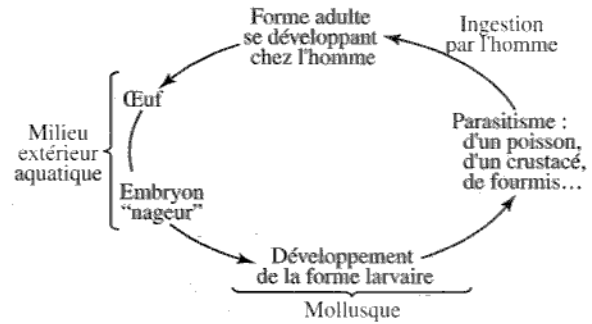


Fig. 6 – Cycle évolutif des douves

1.2.2. Principales douves d'intérêt médical

1.2.2.1. *Fasciola hepatica*: la grande douve du foie

La grande douve du foie mesure de deux à trois centimètres. C'est l'agent le plus fréquent de distomatoses sous nos climats. L'homme s'infecte en buvant de l'eau non potable ou en consommant du cresson sauvage, des pissenlits... La jeune douve sort du kyste ingéré et perce la cavité péritonéale pour s'installer dans les canaux biliaires. L'état adulte est atteint en trois mois.

1.2.2.2. *Dicrocoelium dentriticum*: la petite douve du foie

La taille est plus réduite: 5 à 10 mm de long, 2 mm de large. L'infestation humaine est rare, elle suppose en effet l'ingestion fortuite de fourmis avec du pissenlit ou des salades (la larve évoluant successivement chez un petit mollusque terrestre et chez les fourmis). Elle parasite les voies biliaires et devient adulte en deux mois.

1.2.3. Manifestations cliniques

Lorsque l'infestation est importante, se développe un syndrome « pseudotyphoïdique »: fièvre, douleurs abdominales, hypertrophie du foie, douleurs musculaires et articulaires.

L'éosinophilie est très élevée (50 à 80 % des leucocytes sont des polynucléaires éosinophiles).

En l'absence de diagnostic précoce et de traitement, la maladie évolue vers une hépatite chronique compliquée de crises de coliques hépatiques. Le sujet est asthénique et amaigri. Cet état peut se prolonger des années.

Épidémie de distomatose à *Fasciola Hepatica* dans la région Nord Pas-de-Calais.

Juin 2003 (Institut de veille sanitaire - Département des maladies infectieuses)

INTRODUCTION

La distomatose à *Fasciola Hepatica* est une parasitose dont les principaux réservoirs sont les ruminants. L'affection est acquise par ingestion d'un végétal semi-aquatique contaminé, le plus souvent du cresson sauvage cru. L'incidence de la distomatose humaine est estimée à environ 300 cas/an en France, la dernière épidémie connue dans la région avait touché 7 personnes en 1981.

Le diagnostic de trois cas de douve du foie entre début mars et mi-avril 2002 a été suffisamment inhabituel pour que l'alerte soit donnée, fin avril, par le Centre Hospitalier de Tourcoing. Une rapide concertation des acteurs a permis de programmer l'investigation de cette épidémie.

MÉTHODE

Un cas certain était défini comme une personne habitant la région, ayant une sérologie positive pour la distomatose depuis début 2002.

Une recherche active des cas diagnostiqués a été faite auprès des laboratoires d'immunologie couvrant la région. Par ailleurs, un dépistage des cas suspects était réalisé au travers d'un recensement, auprès des laboratoires, des NFS évocatrices de parasitose, de la sensibilisation des cliniciens et du grand public.

L'enquête exploratoire auprès de tous les malades renseignait sur les facteurs de risques habituels de la distomatose, notamment sur la consommation de cresson, mâche et pissenlit.

Une enquête cas-témoins était réalisée courant mai pour confirmer les hypothèses de l'enquête exploratoire. Étaient inclus tous les cas diagnostiqués au 15/06 et deux témoins appariés par cas (âge +/- 5ans, sexe, lieu de résidence).

Les producteurs ayant fourni les lieux d'achat étaient listés. Leurs cultures étaient ensuite inspectées.

RÉSULTATS

Au total la recherche des cas permettait d'identifier 18 malades. L'enquête exploratoire relevait la consommation de cresson acheté chez 17 d'entre eux. Dans l'enquête cas-témoins, seule était associée à la maladie de façon significative la consommation de cresson cru (ORA: 86.67, $p < 10^{-5}$) ou cuit (OR: 22.0, $p = 0.04$). La fréquence de consommation n'était pas associée à la maladie.

Le cresson avait été acheté en grandes surfaces le plus souvent (15/17) et provenait de plusieurs producteurs; cependant 15 cas avaient consommé les produits d'un même cressiculteur pour les 3 témoins en ayant consommé il s'agissait d'autres producteurs.

Un des sites de production de ce cressiculteur n'était pas protégé des eaux de ruissellement des pâtures voisines.

DISCUSSION

Les résultats des enquêtes cas-témoins, alimentaires et environnementales objectivent un lien entre la consommation de cresson provenant d'une cressiculture et l'épidémie. Celle-ci a touché peu de personnes au regard de la clientèle desservie par les grandes surfaces. Cependant, la non-spécificité des symptômes fait penser que tous les cas ne sont pas diagnostiqués à ce jour.

Cette épidémie rappelle que le risque de distomatose n'a pas disparu et qu'il convient de maintenir un contrôle sur la salubrité des cressicultures.

Cette investigation démontre l'intérêt, face à des contaminations alimentaires, d'un travail en réseau entre cliniciens, biologistes, épidémiologistes et acteurs administratifs.

1.3. Nématodoses

1.3.1. L'ascaridiose

1.3.1.1. Le parasite



Fig. 7 – *Ascaris lumbricoides*

La femelle pond environ 200 000 œufs par jour. L'œuf ne s'embryonne que dans le milieu extérieur et peut rester vivant dans l'humus pendant cinq ans. L'homme s'infeste en consommant des légumes crus souillés. L'évolution de la larve en ver se fait au cours d'un voyage assez compliqué au sein de nos tissus : intestin → foie → sang → cœur droit → poumon → carrefour aérodigestif → intestin. Deux à trois mois après la contamination, les femelles commencent à pondre.

1.3.1.3. Manifestations cliniques

La migration larvaire provoque, dans un premier temps, fièvre, toux, expectoration et hyperéosinophilie (30 à 50 %). Parvenus à l'état adulte, les vers sont à l'origine de troubles digestifs (diarrhées, douleurs) et parfois de troubles nerveux (agitation nocturne, irritabilité).

1.3.2. L'anisakiase (voir document 4)

La consommation de poissons crus, fumés, peu cuits, ou en légère saumure, peut être à l'origine d'une parasitose due à un ascaris des poissons : l'anisakis.

Ascaris lumbricoides est un nématode (ver rond) de quinze à vingt-cinq centimètres de long, blanc rosé (fig. 10.a).

1.3.1.2. Son cycle évolutif (fig. 7 et 8)

L'adulte vit dans l'intestin grêle de l'homme parasité.

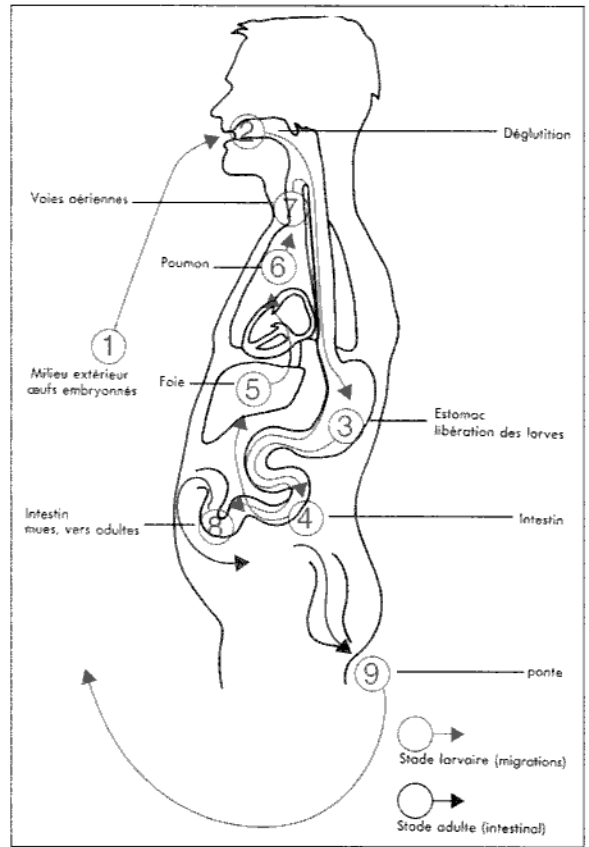


Fig. 8 – Cycle d'évolution de l'*ascaris lumbricoides*

ÉPIDÉMIOLOGIE ET PROPHYLAXIE DE L'ANISAKIASE

Enquête sur l'infestation de 3 espèces de consommation courante en France

V. ANGOT*, P. BRASSEUR**

L'anisakiase, ou « maladie du ver du hareng » est une affection gastro-intestinale due à des larvès de Nématodes anisakidés, genres *Anisakis* sp et *Pseudoterranova* (= *Phocanoma*) *decipiens*, contractée à la faveur de la consommation de poisson cru ou insuffisamment traité. Ces parasites, « Ascaris » de mammifères marins, sont aussi très fréquents chez les poissons, qui jouent le rôle de transporteur [8], et s'infestent en mangeant des invertébrés marins (*krill*) hébergeant la larve infestante (1,3), ou des poissons infestés de petite taille.

Cette pathologie est bien connue des pays nordiques, et plus généralement des régions maritimes, et montre une incidence élevée dans certains pays où le poisson cru fait partie des habitudes alimentaires, comme au Japon où elle atteint 1 000 cas par an [6]. En France, 21 cas ont été diagnostiqués entre janvier 1985 et septembre 1987 [6, 7], il est cependant probable que ce chiffre soit sous-estimé. Le développement du tourisme, la multiplication des restaurants exotiques, sont autant d'incitations à essayer de nouveaux mets ; dont des préparations à base de poisson cru ; il semblait donc opportun de refaire une mise au point sur l'épidémiologie de la maladie.

CLINIQUE

La forme aiguë de la maladie est liée à la pénétration de la larve dans la paroi gastrique, provoquant des ulcérations, à l'origine d'épigastries violentes, avec vomissements, nausées et diarrhées, apparaissant 3 à 6 heures après le repas infestant. Dans les formes subaiguës ou chroniques, la larve pénètre la paroi intestinale, provoquant la formation d'un granulome, voire d'un phlegmon à éosinophiles. Les localisations au duodénum ou aux autres parties de l'intestin grêle sont les plus fréquentes, et le tableau clinique évoque le plus souvent une appendicite, une tumeur, ou un syndrome occlusif. Des cas avec localisation erratique de la larve dans les ganglions, l'oropharynx, l'épiplon... ou des réactions anaphylactiques (urticaire, polyarthrite...), associées ou non à l'une de ces formes, ont également été décrits [2, 3, 7, 9].

Sur le plan biologique, on note une hyperéosinophilie sanguine importante et/ou une sérologie positive ; la sérologie donne des résultats inconstants avec de nombreuses réactions croisées. L'examen des selles est sans intérêt comme dans toutes les larva

migrants, puisque l'on est en présence d'un stade larvaire. La fibroscopie est une méthode de choix pour le diagnostic et constitue, en outre, un moyen de traitement efficace, en permettant l'extraction simultanée de la larve. L'examen anatomopathologique des lésions intestinales révèle, assez souvent, la présence d'une larve d'anisakidés, ou de ses restes. L'anamnèse est un élément essentiel du diagnostic, la consommation récente ou habituelle de poisson cru étant un élément à retenir [2, 3, 7, 9, 10].

ÉPIDÉMIOLOGIE

L'infestation a été recherchée chez diverses espèces de Méditerranée et de mer du Nord, et dans leurs produits de transformation. Les poissons d'eau froide, et notamment les Gadidés (cabillaud, lieu noir et assimilés), Clupeidés (harengs et assimilés), Scombridés (maquereau...) et Scorpenidés (sébaste et rascasse) sont fréquemment atteints. La majorité des larves est trouvée dans les viscères, ou la cavité abdominale. La présence de parasites encapsulés dans la chair apparaît essentiellement chez les espèces les plus parasitées et notamment les Gadidés (merlu = colin, lieu noir et cabillaud) [1, 4, 5, 8].

Étude de l'infestation de 3 espèces courantes (lieu noir, cabillaud, saumon)

Les parasites ont été recherchés par la méthode de mirage (= par transillumination) dans le lieu noir et le cabillaud, espèces de consommation courante en France et en Europe. L'ensemble du matériel, prélevé en 1988 et 1989, était constitué de filets de taille « standard » (200-300 g), et provenait de Boulogne-sur-Mer. Les niveaux d'infestation variaient selon la provenance, et l'espèce (tabl. 1). Le cabillaud de pêche semi-industrielle de la Manche, était très faiblement parasité, les échantillons provenant d'autres pêcheries (Irlande et Écosse) montrant des taux d'infestation plus importants. Chez le lieu noir de pêche industrielle, plus de 50 % des filets examinés étaient parasités (1 à 11 larves/filet). Les larves étaient concentrées au niveau de la paroi abdominale : 80 % des larves chez le cabillaud et plus de 93 % chez le lieu noir; les autres étaient détectées dans les régions dorsales et surtout caudale du filet. Cette distribution montre l'intérêt des diverses techniques de filetage, et notamment du parage du flanc pour diminuer le nombre de parasites. Les filets sans flanc, voire sans arêtes sont en effet bien moins parasités que les filets traditionnels.

Tableau 1. — Infestation des filets de cabillaud (*Gadus morhua*), de lieu noir (*Pollachius virens*), de saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*) et de saumon du Pacifique (*Oncorhynchus kisutch*)

Origine	Cabillaud		Lieu noir	Saumon Atlantique	Saumon Coho
	Manche	Ouest Écosse	Ouest Écosse	Élevage	Pacifique
Infestés/total	7/421	13/68	138/254	0/3 099	24/128
Prévalence (%)	1,7	19,7	54,7	< 0,001	28,4
Intensité moyenne	1,4	1,6	2,1	0	8,5
Abondance	0,02	0,30	1,14	0	2,24

L'enquête sur le saumon, réalisée durant l'hiver 1989, concernait 2 catégories de saumon : des saumons de l'Atlantique d'élevage, provenant de Norvège et d'Écosse, et des saumons Coho du Pacifique, sauvages (*Oncorhynchus kisutch*). Ces derniers étaient couramment infestés (1 à 6 larves par filet), alors qu'aucune larve n'était observée dans les filets de saumon Atlantique d'élevage. Au vu des résultats statistiques, on peut déduire que l'infestation serait inférieure à 2/1 000 chez le saumon de Norvège, et inférieure à 5/1 000 chez le saumon d'Écosse ($\alpha = 5\%$).

DISCUSSION

La provenance géographique paraît déterminante pour le niveau d'infestation. La dissémination de l'infestation serait liée essentiellement à la richesse du plancton en Euphausiidés, qui sont les principaux hôtes intermédiaires d'*Anisakis*, et au nombre de mammifères marins, hôtes définitifs, dans l'environnement [Van Banning]. La probabilité du parasitisme musculaire est beaucoup plus grande chez les espèces piscivores et les individus de grande taille. L'élevage semble limiter considérablement le risque d'infestation.

Les variations saisonnières, parfois relevées, sont liées à un changement des lieux de pêche plus qu'à une réelle variation de l'infestation. Enfin, l'hypothèse d'une migration des larves vers la chair après le mort du poisson, semble de plus en plus improbable, considérant notamment que tous les Gadidés sont éviscérés dès la capture [8].

Le congrès de Kiel, en 1989, sur les Nématodes parasites dans les pêcheries d'Atlantique nord a souligné la fréquence de l'infestation dans toutes les pêcheries européennes. Le problème sanitaire, lié à la consommation de produits crus ou improprement préparés est apparu peu important dans les pays du Nord de l'Atlantique. L'application de mesures sanitaires élémentaires, telles que le retrait des parties parasitées et l'usage de techniques de fabrication adaptées, est nécessaire et suffisante pour garantir la salubrité des produits prêts à la consommation. Il est toutefois impossible de garantir qu'un produit est absolument exempt de larves [8].

Prévention de l'anisakiase

La prophylaxie repose sur l'élimination, ou la destruction des larves, tuées par des températures supérieures à 60 °C ou inférieures à -18 °C à cœur pendant 24 h. La directive du conseil des Communautés européennes du 22 juillet 1991 impose le traitement par congélation des produits transformés, à base de hareng, sprat, maquereau et saumon sauvage. Cependant, si l'on cherche à garantir la salubrité des produits « prêt-à-consommer », il serait souhaitable que l'ensemble des poissons destinés à un fumage à froid, ou à un autre procédé insuffisant, soit soumis à un tel traitement.

Dans les produits frais, la présence de parasites reste plus qu'un problème économique — les larves donnant un aspect peu appétissant —, qu'un problème de santé publique, le poisson étant le plus souvent consommé cuit. Il est donc souhaitable de rechercher les larves présentes et de retirer toute partie parasitée, avant la mise en vente.

La prévention passe également par une information du consommateur, comme l'ont fait le ministère de l'Agriculture (D.G.A.) et le secrétariat d'État à la Mer, au début de l'année 1988. Les articles parus dans la presse féminine à grand tirage peuvent par contre avoir des effets pervers, faute d'une réelle information. En effet, dans un de ces journaux, en 1991, on pouvait lire un article sur l'anisakiase et trouver quelques pages plus loin des recettes de poisson cru « à la Tahitienne ».

PRÉVENTION DE L'ANISAKIASE

Conseils aux consommateurs

La cuisson à cœur est la plus sûre méthode de prévention, les temps de cuisson classiquement recommandés sont largement suffisants (15 min. au court-bouillon pour un morceau de 500 g par exemple). L'absence de sang à l'arête et une chair se détachant facilement signifieront une cuisson à point.

Pour la préparation de plats à base de poisson cru, on veillera aux points suivants :

- choisir des espèces de pêche côtière souvent moins parasitées telles que la daurade, le cabillaud, le merlan de petite pêche;
- retirer la partie abdominale du filet;
- congeler les gros poissons (lingue et lieu noir notamment), 2 à 3 jours à l'avance (congélateur ménager).

* Direction générale de l'alimentation - Services vétérinaires, 75013 Paris.

** Laboratoire de parasitologie, C.H.U. — Hôpital Charles-Nicolas, 76038 Rouen Cedex.

Bien connue aux Pays-Bas, au Japon, en Amérique du Nord, l'anisakiase a fait plus récemment son apparition en France (20 cas en un an et demi sur 1987-1988), en Allemagne, en Italie..., certainement du fait de l'évolution des consommations.

Anisakis simplex est un parasite des baleines, des dauphins, des otaries qui constituent des hôtes définitifs. Les œufs résultant de la reproduction sexuée sont éliminés par leurs fèces dans le milieu marin où ils s'embryonnent. Les larves sont alors absorbées par des crevettes (premier hôte intermédiaire) puis par des poissons : harengs, maquereaux, cabillauds, saumons, lieus noirs (deuxième hôte intermédiaire). Le cycle se referme lorsque les mammifères marins ingèrent les poissons. À la mort des poissons, les larves présentes dans l'intestin gagnent lentement les chairs. Ce temps de latence explique que les pêcheurs, qui consomment le poisson peu de temps après sa capture, ne soient jamais infestés. C'est aussi un argument pour l'éviscération précoce du poisson car on élimine alors la larve avec le contenu intestinal.

L'homme se contamine par ingestion de poissons parasités. La larve étant détruite par la chaleur (10 secondes à 55 °C) et par congélation, on comprend que le risque reste limité aux habitudes de consommation déjà évoquées et que cette parasitose reste assez rare dans notre pays.

La prévention de l'anisakiase repose sur la destruction des larves par une cuisson suffisante (température supérieure à 65 °C à cœur) ou par la congélation. La directive CEE du 22 juillet 1991 impose le traitement par congélation des produits transformés à base de hareng, sprat, maquereau et saumon sauvage.

1.3.3. Les trichinelloses

Trichinella spiralis est un petit nématode mesurant 1,5 mm. 4 µ pour le mâle et 3 à 4 mm. 60 µ pour la femelle. Les vers adultes vivent dans l'intestin grêle de l'homme et de nombreux animaux. Les larves, pondues dans la paroi de l'intestin par les femelles vivipares, passent dans la circulation lymphatique puis dans la circulation générale et s'enkystent dans les muscles. Pour se transformer en adultes, les larves doivent passer par un nouvel hôte par ingestion de viande parasitée.

L'homme contracte la trichinellose en ingérant les larves contenues dans des viandes parasitées peu ou mal cuites. De 1976 à 1994, plus de 1 700 cas de trichinellose ont été provoqués par la consommation de viande de cheval importée (voir document 5). La viande de porc, de sanglier, de phoque, peut également être un vecteur de trichinellose.

Les pays européens ont des prévalences très contrastées en fonction des espèces susceptibles d'être contaminées par la trichine (porc, renard, cheval, sanglier...).

La France n'a plus connu de cas de trichinellose chez l'homme liés à de la viande contrôlée depuis 1998. Plus de 1000 cas humains ont été évités grâce à l'identification de viande contaminée avant consommation (2 chevaux, 9 porcs, plusieurs sangliers).

Les cas survenant en France résultent de l'ingestion de viande non contrôlée de sanglier.

La trichinellose peut être évitée en faisant cuire à cœur la viande à 63°C ou en la congelant à -20°C pendant 3 jours.

Les principaux symptômes sont la diarrhée (facultative), la fièvre, les douleurs musculaires, l'œdème de la face et du cou.

ENQUÊTE SUR L'INCIDENCE DE LA TRICHINELLOSE EN FRANCE (1994-1995)

Jean DUPOUY-CAMET, Silmarra ALLEGRETTI, Tan Phong TRUONG

Laboratoire de Parasitologie-Mycoologie, CHU Cochin, 27, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris

La Trichinellose, parasitose provoquée par l'ingestion de viande crue contenant les larves infestantes d'un nématode du genre *Trichinella*, est à nouveau menaçante pour la santé de l'homme en France. En effet, depuis 1976, 6 épidémies provoquées par la consommation de viande de cheval ont impliqué plus de 1 700 cas. Ces épidémies étaient particulières par leur caractère urbain, le grand nombre de sujets atteints (431 cas et 642 cas en 1985, 538 cas en 1993), la dispersion des foyers liés à une même carcasse (en liaison avec les réseaux de distribution) et, le fait que toutes les carcasses responsables avaient été importées de l'étranger (continent américain, Europe de l'est). Parallèlement, des épidémies de trichinellose liées à la consommation de viande de sanglier sont de plus en plus souvent signalées : 4 épidémies de ce type publiées de 1952 à 1984, de 1985 à 1994. Cette augmentation n'est-elle qu'apparente ? (meilleure connaissance de la maladie par les médecins) ou réelle et liée à l'explosion des populations de sangliers (plus de 100 % en 20 ans, d'après l'Office National de la Chasse) et à l'éventuelle modification des habitudes culinaires des chasseurs et de leur famille. Ne disposant d'aucune donnée sur l'incidence de la trichinellose humaine autochtone, nous avons donc effectué une enquête auprès de l'ensemble des laboratoires hospitalo-universitaires de Parasitologie de France métropolitaine.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

L'ensemble des 34 laboratoires hospitalo-universitaires de Parasitologie a reçu un questionnaire leur demandant d'indiquer le nombre de demande de sérologies de trichinelloses reçues du 1er juin 1994 au 31 décembre 1995, le nombre de sérologies trichinellose trouvées positives et les techniques sérologiques utilisées. Cette période avait

été choisie de façon à exclure les cas engendrés par l'anadémie de décembre 1993 et dus à la consommation de viande de cheval.

Si ces laboratoires avaient eu des sérologies positives, il leur était demandé de préciser si cette sérologie correspondait à une trichinellose certaine (biopsie musculaire positive), probable (diagnostic retenu par le clinicien) ou s'il s'agissait d'une réaction croisée dans le cadre d'une autre affection parasitaire ou générale. Pour les cas certains ou probables, il était demandé de préciser le type de viande responsable, la date approximative et lieu du contage, si ce ou ces cas s'inscrivaient dans un contexte isolé ou épidémique et, enfin, s'ils avaient fait l'objet d'une publication. Les patients étaient identifiés par les quatre premières lettres du nom et le prénom pour éviter d'éventuels doublons.

RÉSULTATS

Des résultats ont pu être obtenus pour tous les laboratoires contactés (tableau 1). Ceux-ci ont pratiqué dans la période considérée au moins 4 700 sérologies de trichinellose. Parmi celles-ci, 136 étaient positives et 42 correspondaient à des cas de trichinellose probables ou certains. Parmi ces 42 cas, 25 étaient des cas qui s'étaient déclarés dans la période considérée et 17 correspondaient à des suivis sérologiques de cas déclarés antérieurement au 1^{er} juin 1994 (patients infectés lors de l'épidémie de décembre 1993). Seul, un cas était certain car la biopsie musculaire était positive. Aucune biopsie musculaire n'a été effectuée parmi les 41 autres cas diagnostiqués sur des critères cliniques ou biologiques.

Six patients avaient contracté la trichinellose à l'étranger (Kenya, Groenland, Turquie) par consommation de viande de porc, de phacochère ou d'ours polaire. Pour les 19 cas autochtones, la source de

Tableau 1 – Nombre, source et origine géographique des cas de trichinellose rapportés en France du 1er juin 1994 au 31 décembre 1995 par les laboratoires hospitalo-universitaires de parasitologie.

CHU	Cas	Sources	Origine
Amiens	2 1a?	Porc ?	Turquie ?
Lyon Pasteur	2	Sanglier	Camargue
Montpellier	3c	Sanglier	Cévennes
	3	Sanglier	Pyénées Orientales
	1	Sanglier	Camargue
Nantes	1b	Cheval	La Rochelle
Nice	1	Sanglier	Camargue
Nîmes	1	Sanglier	?
Paris-Bichat	11b	Cheval	Paris
Paris-Pitié-salpêtrière	5b	Cheval	Paris
	5c	Cheval	Seine et Mame
	1c	Ours blanc	Groenland
Reims	1c	Cheval	Paris
Rouen	1	Porc?	Turquie?
Saint-Étienne	1	Sanglier	France
Toulouse, Rangueil	2	Phacochère	Kenya
Angers, Besançon, Brest, Bordeaux, Clermont-Ferrand, Dijon, Grenoble, Lille, Limoges, Lyon-CHU, Marseille, Nancy, Paris-Avicenne, Paris-Cochin, Paris-St-Antoine, Paris-Mondor, Paris-St-Louis, Poitiers, Rennes, Strasbourg, Tours, Toulouse-Purpan	0		
Total des cas sérologiques	42		
Total des cas s'étant déclarés dans la période choisie	25		

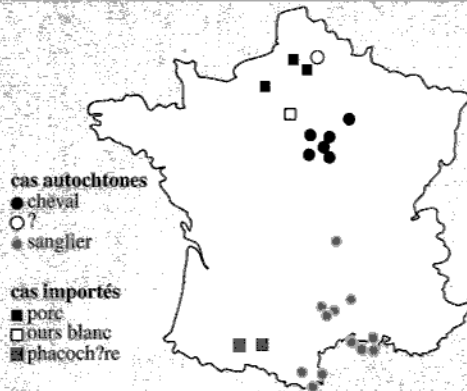
a : pas de précisions cliniques mais biopsie musculaire positive

b : malades contaminés en décembre 1993 et suivis sérologiquement (BEH, 1994, 29: 127-129)

c : observations publiées (10 au total)

* Nancy adresse ses sérums à l'Hôpital de la Pitié Salpêtrière à Paris

Figure 2. Répartition géographique des cas de bothriocéphalose identifiés en Haute-Savoie (1993-2000)



une autre atteinte parasitaire (ascaridose ou toxocarose : 14 cas, anguillulose : 6 cas, bilharziose : 4 cas, filariose : 4 cas, distomatose : 3 cas, parasitose ou pathologie indéterminée : 2 cas). Les 61 dernières sérologies, faiblement positives, n'ont pu être expliquées par le tableau clinique, ayant motivé leur prescription. Les 21 laboratoires ayant déclaré des sérologies de trichinellose positives utilisent soit des techniques non commercialisées et de réalisation artisanale (immunofluorescence indirecte pour 15 laboratoires, immunodiffusion pour 2 laboratoires) soit des techniques commercialisées (Elisa pour 6 laboratoires). Quatre laboratoires utilisent 2 techniques. Le pourcentage des sérologies de trichinellose positives (toutes causes confondues) variait selon les régions : 0,6 % dans l'est, 1,1 % dans le centre, 2,1 % dans le nord, 2,5 % dans la région Rhône-Alpes, 3,6 % dans la région parisienne, 4,8 % dans le sud-ouest, 6,7 % dans l'ouest et 13 % dans la région Méditerranéenne.

DISCUSSION

Cette enquête rétrospective, à notre connaissance la première du genre, permet une évaluation de l'incidence de la trichinellose en France. La définition des cas a été volontairement simplifiée de façon à faciliter le travail des correspondants au sein de chaque laboratoire de Parasitologie. La trichinellose autochtone due à la consommation de

viande de sanglier sévit dans le sud-est de la France (en particulier dans les régions méditerranéennes) alors que les trichinelloses d'importation ou d'origine chevaline sont surtout l'apanage de l'Île-de-France au sens large (figure 1). La trichinellose autochtone due au porc est inexistante mais, il faut rester vigilant sur ce point car actuellement de nombreux agriculteurs élèvent leurs porcs dans des espaces naturels et non plus dans des porcheries. Ce nouveau mode d'élevage pourrait ne pas être dénué de risques dans les zones où sévit la trichinellose à l'état naturel (sud-est de la France et régions méditerranéennes).

Cette enquête n'est probablement pas exhaustive car elle n'a concerné que les laboratoires hospitalo-universitaires. En effet, la sérologie de la trichinellose peut être pratiquée par tout laboratoire d'analyse médicale (il existe des kits commercialisés) mais de fait, devant le peu de demande de cette sérologie, ceux-ci préfèrent la transmettre à des centres plus importants, hospitalo-universitaires ou privés. Ces derniers n'ont pas été impliqués dans cette enquête. Cependant, la validité de notre enquête est confirmée par le fait qu'elle a permis de retrouver 10 des 12 cas publiés dans la même période. Elle permet surtout de détecter 15 cas supplémentaires.

Bien que les laboratoires hospitalo-universitaires essaient de recueillir des informations cliniques ou biologiques pour pouvoir interpréter une réaction sérologique positive, 61 des 136 sérologies positives révélées par notre enquête n'ont pu être expliquées. Il s'agissait de réactions faiblement positives pouvant correspondre à des réactions croisées non identifiées ou éventuellement à une exposition ancienne asymptomatique à *Trichinella*. Ces réactions faiblement positives pourraient également être liées à des seuils de positivité trop bas. En effet, les techniques utilisées ne sont pas comparables car les différents laboratoires utilisent pour la plupart (80 %) l'immunofluorescence indirecte ou l'immunodiffusion avec des antigènes préparés localement et sans sérum seuil de référence interlaboratoires et rares sont les laboratoires qui ont pu calculer des seuils précis de positivité. La prévalence, région par région, des réactions sérologiques positives semble peu superposable au nombre de cas humains rapportés dans cette enquête mais on note, cependant, une prévalence plus élevée dans des régions où historiquement des épidémies de trichinellose ont été rapportées (régions toulousaine et méditerranéenne, foyer de Vendée de 1993, région parisienne). Nous avons pu montrer récemment qu'une technique d'immunoeempreinte permettait d'affiner le diagnostic sérologique de la trichinellose et d'éliminer bon nombre de réactions croisées non spécifiques [6]. Mais cette technique n'a pu être utilisée dans cette enquête rétrospective.

Enfin, les cas rapportés par foyer épidémique sont peu nombreux. Le faible nombre de cas du foyer d'origine chevaline de Seine-et-Marne a pu être expliqué par l'enquête vétérinaire qui a montré que ce foyer avait été provoqué par la commercialisation d'un morceau de quelques kilogrammes, désossé, réfrigéré sous vide puis importé du Mexique par un grossiste de Belgique. De plus, les 7 foyers épidémiques provoqués par de la viande de sanglier ne comptent que 1 à 3 cas par foyers. Ceci peut s'expliquer par la cuisson suffisante habituelle de la viande de sanglier mais aussi par la sous-évaluation d'une maladie qui survient en zone rurale en automne ou en hiver (périodes de chasse) et qui peut passer inaperçue en période de syndromes grippaux. Une enquête active autour des cas isolés aurait sans doute permis d'identifier des cas supplémentaires.

CONCLUSIONS

Cette enquête auprès des laboratoires spécialisés de Parasitologie montre que 25 cas de trichinellose ont été rapportés en France sur 19 mois, la trichinellose autochtone due à la consommation de viande de sanglier ne s'observe que dans le sud-est de la France alors que les trichinelloses d'importation ou d'origine chevaline s'observent, le plus souvent, dans le nord de la France. La trichinellose autochtone due au porc est inexistante. Cette enquête répond aux recommandations de la Commission internationale sur la trichinellose qui souhaite disposer pour chaque pays d'une évaluation de l'incidence de cette zoonose. Un renouvellement de cette enquête permettra de juger de la tendance évolutive de cette zoonose mais il serait utile de renforcer les enquêtes actives dans l'entourage des cas isolés.

2. Parasitoses d'origine alimentaire impliquant des protozoaires

2.1. La toxoplasmose

2.1.1. Le parasite : *Toxoplasma gondii* (fig.9) et son cycle (fig.10)

Le toxoplasme est un protozoaire qui existe sous trois formes :

- le **trophozoïte** qui est une cellule en croissant de 5 à 8 μ m de long pour 2 à 5 μ m de large ; il évolue chez le chat, hôte définitif, pour donner des gamètes : microgamètes mâles et macrogamètes femelles dont la fusion aboutit à l'oocyste ;

- l'**oocyste** est éliminé par les selles du chat ; c'est un œuf de 10 à 12 μ m entouré d'une coque très résistante.

En milieu humide, il évolue pour donner la forme infestante : le sporozoïte.

Ingéré par un hôte intermédiaire, le sporozoïte se transforme en trophozoïte ;

- le **kyste**. Chez l'hôte intermédiaire, les trophozoïtes se multiplient et s'enkystent. Le kyste est un amas de toxoplasmes entouré d'une membrane très résistante ; il mesure de 15 à 100 μ m.

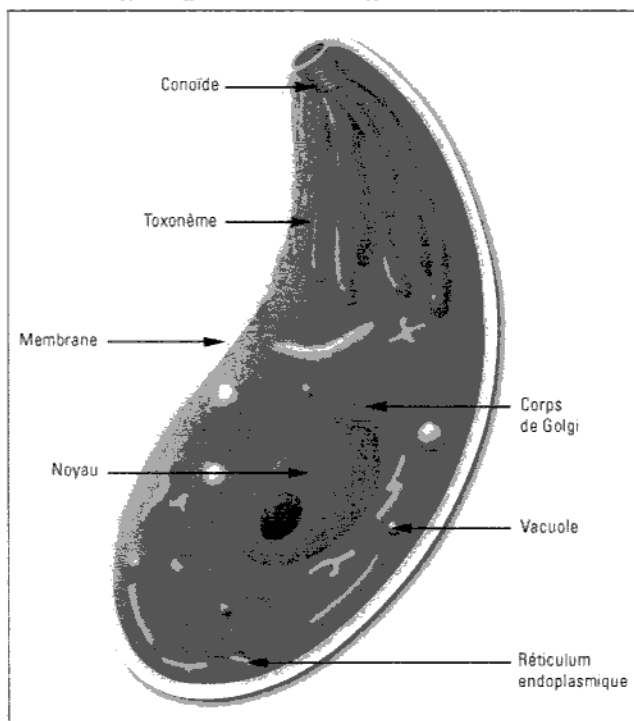


Fig. 9 – Schéma de *Toxoplasma gondii* (document bioMérieux)

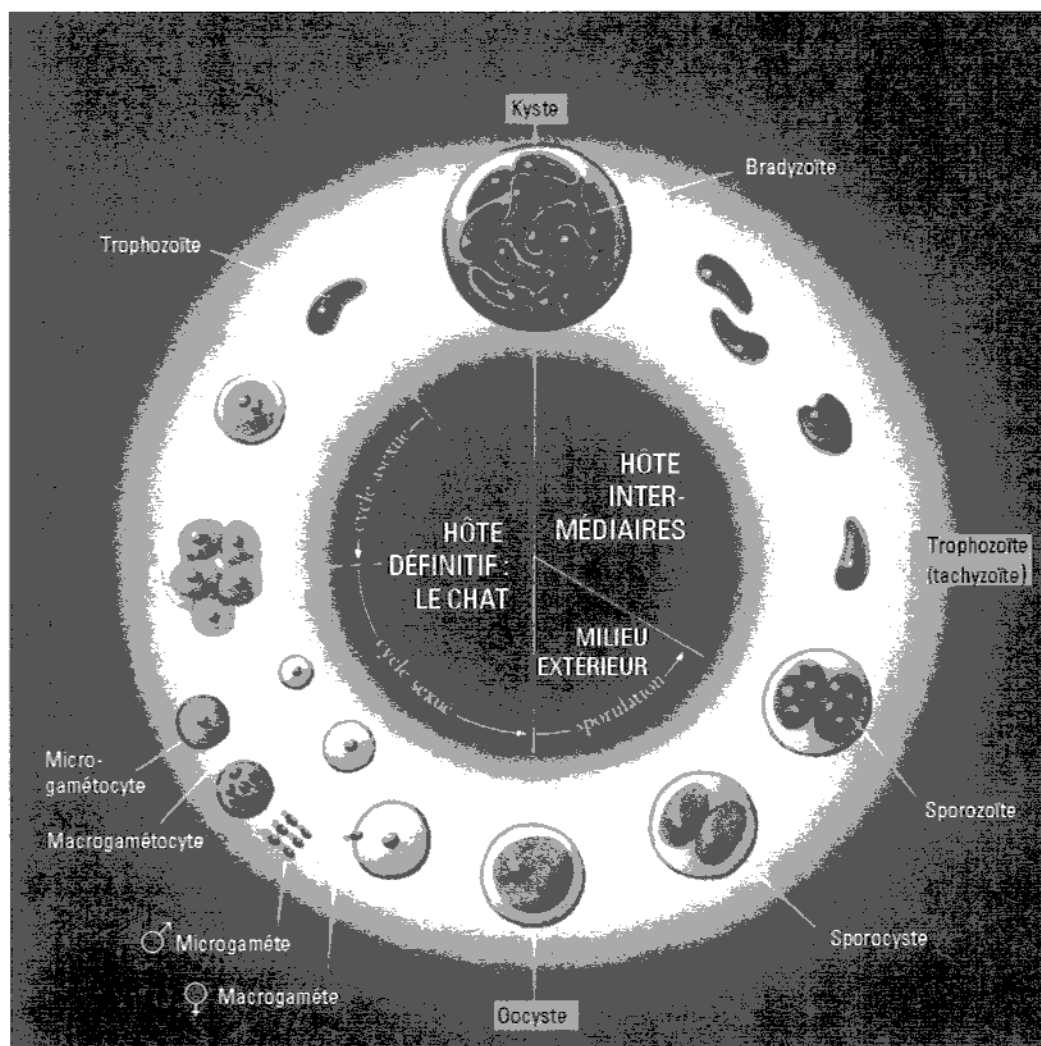


Fig. 10 – Cycle d'évolution de *Toxoplasma gondii* (document bioMérieux)

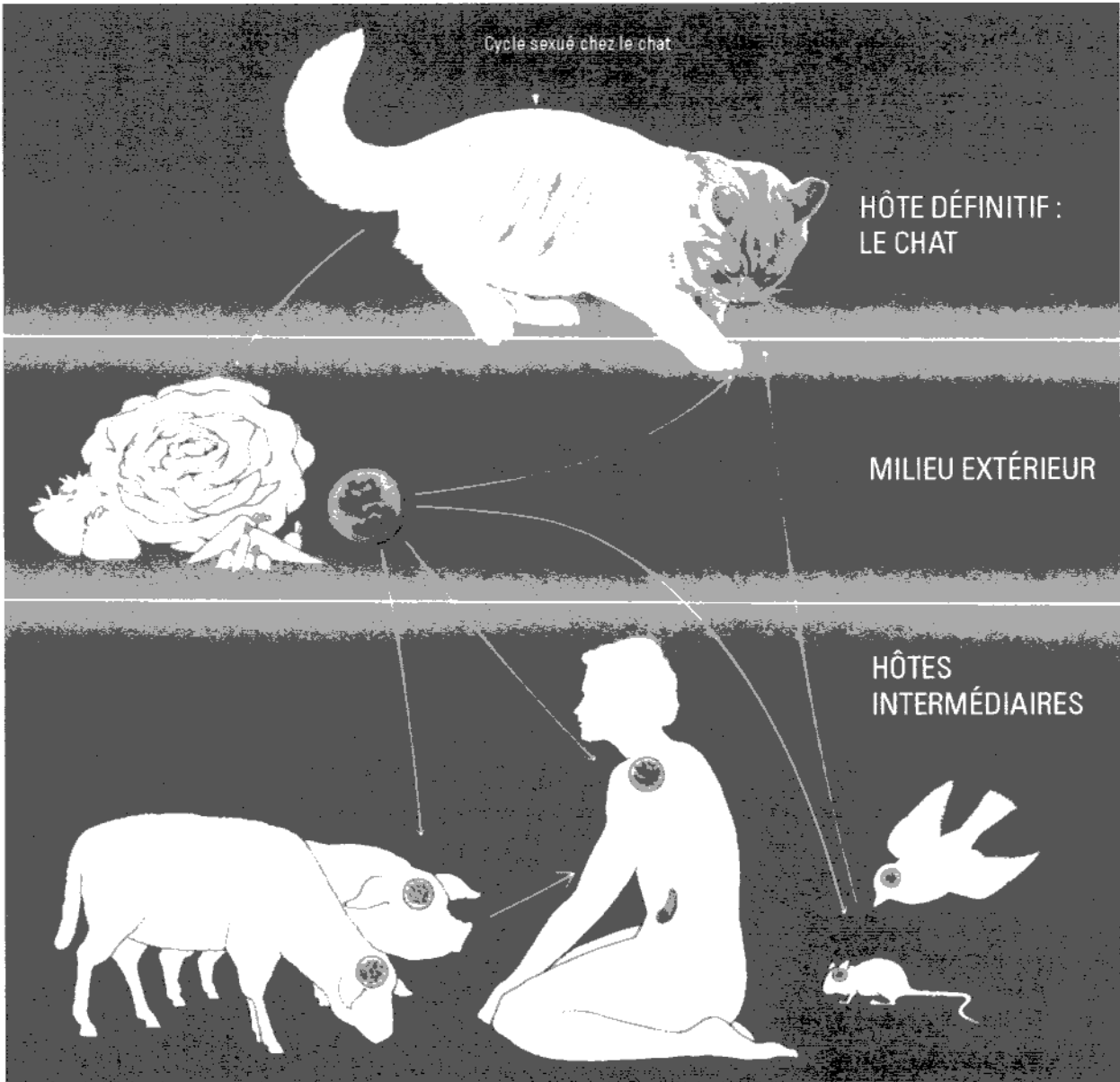


Fig. 11 – Cycle de transmission du toxoplasme (document bioMérieux)

Les hôtes intermédiaires sont des mammifères herbivores, des rongeurs, des porcs, des oiseaux, tout animal fouillant le sol. Les kystes sont présents dans les muscles ou le système nerveux (fig.11).

L'homme se contamine par ingestion de viande insuffisamment cuite, plus rarement par les végétaux crus. C'est un hôte intermédiaire. Les kystes absorbés avec la viande libèrent des formes trophozoïtes qui s'enkystent à leur tour. La toxoplasmose humaine se traduit donc par la présence de kystes dans les muscles ou le système nerveux central.

2.1.2. Manifestations cliniques

2.1.2.1. Toxoplasmose acquise (fig. 12)

Chez l'adulte et l'enfant, les manifestations de la toxoplasmose sont en général bénignes : polyadénopathies fébriles, fatigue, mononucléose. Certaines infestations restent inapparentes.

Cependant, les sujets immunodéprimés sont très sensibles et la toxoplasmose peut être, dans ce cas, gravissime, voire mortelle.

2.1.2.2. Toxoplasmose congénitale (fig.12)

Elle résulte du passage des toxoplasmes au travers du placenta avec infestation du fœtus. Une femme immunisée avant sa grossesse (80 % des cas car la toxoplasmose acquise est une affection très fréquente) ne peut en aucun cas donner naissance à un enfant contaminé.

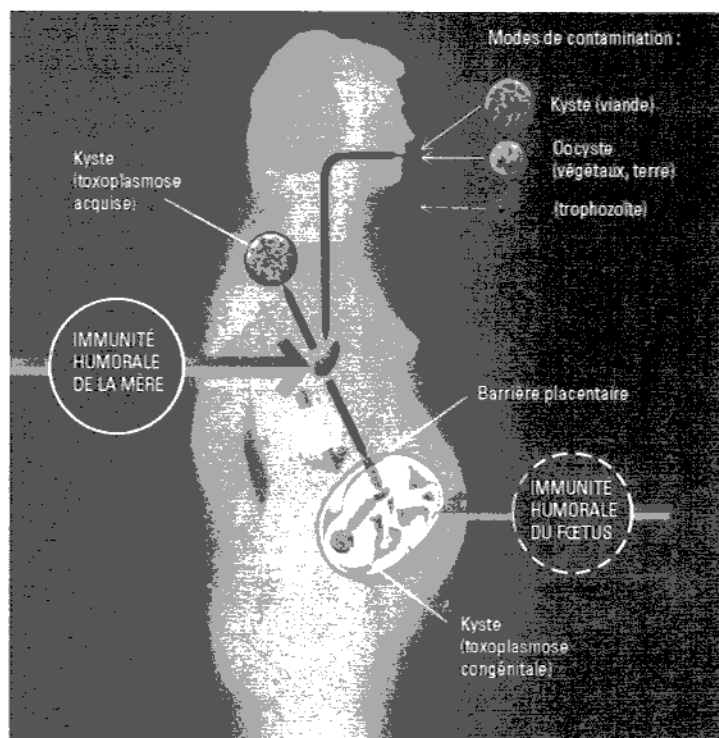
Une femme non immunisée, contaminée pendant sa grossesse, peut transmettre le parasite au fœtus bien que le passage transplacentaire soit loin d'être systématique.

Le fœtus est très sensible à l'infestation toxoplasmique et l'enfant contaminé peut développer une maladie grave: ictère néonatal, hydrocéphalie avec retard psychomoteur, encéphalopathies, chorioretinites...

Le problème sanitaire est donc important chez les femmes enceintes. Le risque de contamination pendant la grossesse a pu être évalué à 0,8 % chez les femmes non immunisées.

Les femmes enceintes non immunisées font l'objet d'un suivi médical. Des mesures de prévention sont nécessaires: bien cuire la viande, éviter les contacts avec les chats, laver abondamment les végétaux crus et limiter leur consommation.

Fig. 12 – Toxoplasmose acquise et toxoplasmose congénitale
(document bioMérieux)



2.2. L'amibiase

C'est une parasitose due à l'amibe dysentérique *Entamoeba histolytica*, protozoaire strictement humain et électif du côlon. Très répandue dans les pays chauds, elle est responsable, sous nos climats, de foyers limités au cercle familial ou à de petites collectivités.

2.2.1. Les cycles d'*Entamoeba histolytica*

• Le cycle normal

Le cycle normal, non pathogène, est celui observé chez les porteurs sains: l'amibe, de petite taille (12 à 15 µm), se nourrit dans l'intestin de bactéries et de débris, et se multiplie par scissiparité. Après quelques divisions, ces amibes donnent naissance à des kystes mûrs, typiques, à 4 noyaux.

• Le cycle anormal

Le cycle anormal, pathogène, se manifeste par l'accroissement de la taille (20 à 40 µm); l'amibe devient hématophage. Ces formes se multiplient activement par scissiparité et sont à l'origine de diarrhées glaireuses et sanguinolentes qui les éliminent dans le milieu extérieur. Les formes pathogènes peuvent aussi évoluer en kystes à 4 noyaux.

2.2.2. Épidémiologie

La contamination est interhumaine et toujours d'origine fécale. Elle est assurée par les eaux de boisson polluées, les crudités souillées par le sol fécalisé et par des aliments contaminés par les mains sales de porteurs de kystes.

2.2.3. Manifestations cliniques

Les manifestations de l'amibiase sont essentiellement digestives et peuvent se présenter sous forme d'une dysenterie ou d'une colite. La complication majeure est l'hépatite amibienne.

• La dysenterie amibienne

Elle survient brusquement et associe l'émission fréquente (une dizaine par jour) de selles afécales, muqueuses, sanguinolentes, peu abondantes et des douleurs colitiques violentes et intermittentes.

Un traitement précoce peut assurer la guérison définitive, sinon la maladie évolue vers la chronicité avec des rechutes.

• La colite amibienne

C'est la forme la plus classique de l'amibiase en France. La symptomatologie est moins typée: douleurs vagues épigastriques, sensation de tension abdominale après les repas, constipation chronique entrecoupée d'épisodes diarrhéiques déclenchés par des excès alimentaires ou l'absorption d'alcool.

• **L'hépatite amibienne**

Dans sa forme la moins grave, on observe une hépatite congestive: hépatomégalie douloureuse avec fièvre et hyperleucocytose.

L'hépatite suppurée, encore appelée abcès amibien du foie, complique l'hépatite congestive. Une ponction ramène un pus amicrobien, couleur chocolat.

2.3. Les flagelloses intestinales

Les protozoaires flagellés intestinaux parasites de l'homme sont représentés par trois espèces principales: *Giardia intestinalis*, *Trichomonas intestinalis*, *Chilomastix mesnili*. La giardiose est la parasitose la plus fréquente due à cette catégorie d'organismes.

L'homme s'infeste en ingérant des kystes apportés par des aliments contaminés. Les sujets parasités manipulant des denrées jouent probablement un rôle essentiel.

La giardiose se manifeste classiquement par la production d'une diarrhée subaiguë ou chronique avec, par jour, émission de quatre à cinq selles de consistance variable: liquide, pâteuse, à prédominance matinale ou postprandiale.

La recherche des formes végétatives dans les selles est un élément important du diagnostic, les kystes en effet peuvent être trouvés dans les selles normales.

CHAPITRE VI

CONSERVATION DES ALIMENTS

Pouvoir étaler dans le temps la consommation du produit d'une chasse, d'une pêche, d'une récolte, se prémunir en période d'abondance contre les pénuries à venir, pouvoir assurer l'alimentation d'un groupe au cours d'un long voyage (navigateurs), voici quelques raisons qui, depuis très longtemps, ont incité l'homme à rechercher des procédés de conservation.

Sécher, saler, acidifier, confire dans la graisse ou le sucre ont été longtemps les seuls moyens connus et pratiqués pour conserver les aliments avant la découverte, par Nicolas Appert, de la stérilisation par la chaleur. Ce procédé s'est rapidement imposé; aujourd'hui la fabrication de conserves appertisées concerne un millier de produits différents.

Après la découverte de l'intérêt des traitements par la chaleur, une nouvelle étape a été franchie avec la conservation par le froid. Les Esquimaux savaient conserver leurs aliments dans la glace. C'est en 1876 que Charles Tellier inventa la première « armoire conservatrice », ancêtre de notre réfrigérateur. On put alors réfrigérer en tout lieu et en toute saison. En 1929, Clarence Bird-Seyne inventait le procédé de surgélation.

D'autres procédés ont été depuis utilisés avec succès: déshydratation, lyophilisation, action des rayonnements ionisants, utilisation d'additifs aux propriétés antimicrobiennes (les conservateurs). Quel qu'en soit le principe ou le protocole, un procédé de conservation a pour but soit de bloquer ou de ralentir l'évolution des flores microbiennes de l'aliment, soit de les détruire.

Deux objectifs peuvent être recherchés:

- la **stabilisation de l'aliment** assurée par un traitement qui bloque ou freine le développement microbien. S'il s'agit d'un procédé différent de la conservation au froid, on obtient des semi-conserves qui doivent être transportées et stockées à basse température;
- la **stérilisation de l'aliment** qui consiste à détruire les micro-organismes et les enzymes de l'aliment. Elle débouche sur des conserves qui peuvent être transportées et stockées à température ambiante.

1. Procédés de conservation utilisant la destruction des micro-organismes par la chaleur

1.1. Analyse théorique – Principaux paramètres

1.1.1. Cinétique de l'inactivation

Soumettons une culture microbienne à une température constante, assez élevée pour exercer un effet nuisible sur une population.

Mesurons l'évolution du nombre N de cellules microbiennes revivifiables en fonction du temps. Soit N_0 leur nombre au début de l'expérience. Portons les valeurs mesurées de N en ordonnée et celles de t en abscisse.

La représentation graphique obtenue montre que la décroissance de la population microbienne est exponentielle en fonction du temps.

Cela peut s'écrire sous la forme:

$$\frac{dN}{dt} = -kN$$

dN étant le nombre de micro-organismes inactivés dans l'espace de temps dt lorsque dN et dt sont très petits (*fig. 1*).

Ces résultats sont transposables à l'aliment.

- Le premier enseignement de cette expérience est que la **vitesse d'inactivation** dN/dt dépend de la charge microbienne de départ. Le temps nécessaire pour obtenir, à une température donnée, un résultat acceptable est d'autant plus long que l'aliment est plus contaminé.
- Un deuxième enseignement est que l'on ne peut obtenir, quel que soit le temps de chauffage, une stérilisation parfaite ($N = 0$ pour $t: +\infty$)

À partir d'un certain temps, N s'exprimera en fraction de bactérie! Il faut donc appréhender la notion de stérilisation sous un angle statistique. Dire, par exemple, que $N = 10^{-3}$ signifie qu'il existe un risque sur 1 000 pour que persiste une bactérie dans le volume stérilisé.

Tout revient alors à définir, pour chaque catégorie d'aliments, voire de préparations, la valeur du rapport N/N_0 satisfaisant aux critères de la « stérilité commerciale » (on dit aussi « stérilité pratique »).

1.1.2. Vitesse relative d'inactivation

L'équation précédente peut aussi s'écrire :

$$\frac{dN}{dt} = -kN$$

k est la vitesse relative d'inactivation.

Elle est constante pour les conditions expérimentales choisies et ne dépend pas de la charge microbienne initiale. Elle représente la fraction de la population de micro-organismes, encore vivants au temps t , qui seront détruits à chaque intervalle de temps dt .

1.1.3. Temps de réduction décimale

Les mêmes résultats font l'objet d'une autre représentation graphique: on place, en utilisant du papier semi-logarithmique, en ordonnée $\log N/N_0$ et, en abscisse, les valeurs correspondantes du temps.

Cette représentation permet de déterminer un autre paramètre: le **temps de réduction décimale D**.

C'est le temps de chauffage permettant, à une température déterminée, de diviser par 10 le nombre de micro-organismes revivifiables. Ce temps est constant pour une température donnée (en général exprimée en indice, par exemple $D_{121} = D$ à 121 °C).

D diminue lorsque la température augmente.

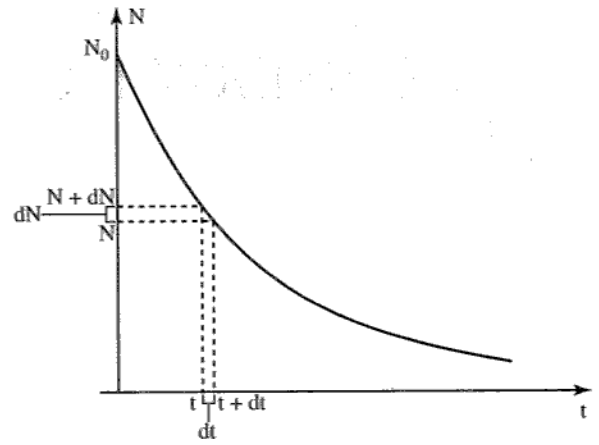


Fig. 1 – Cinétique de l'inactivation

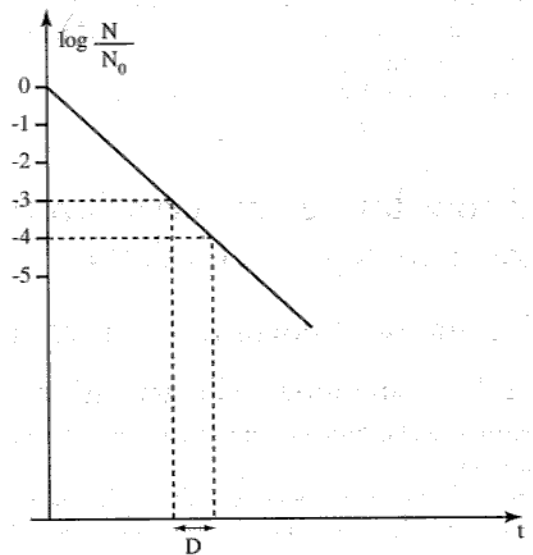


Fig. 2 – Détermination graphique du temps de réduction décimale

1.1.4. Influence de la température

Des cultures identiques sont placées, pendant la même durée, au contact de températures variables. On détermine pour chaque température la valeur de k .

k décroît exponentiellement avec l'inverse de la température.

Une augmentation de la température accélère donc le processus d'inactivation.

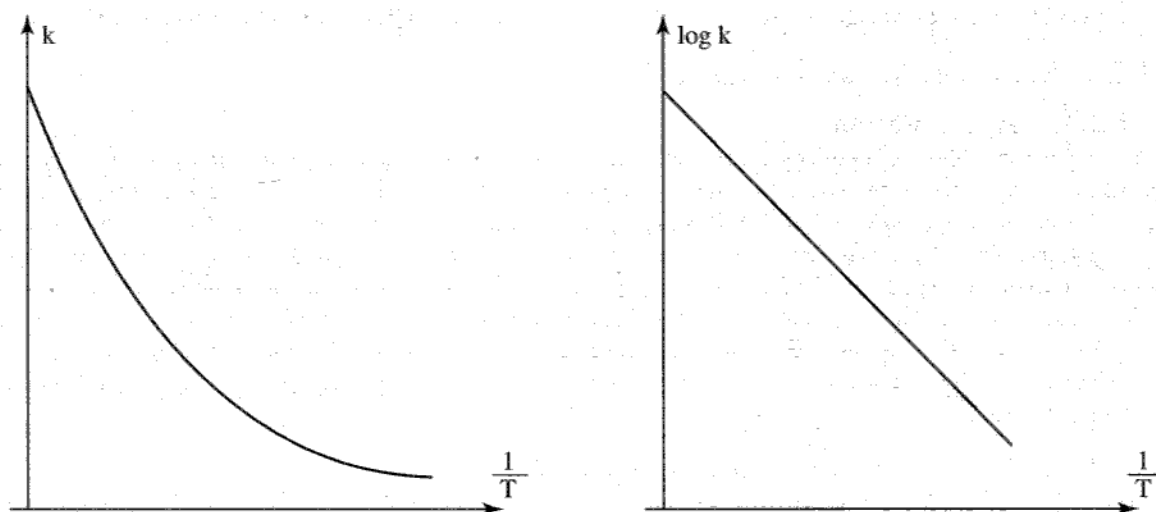


Fig. 3 – Influence de la température sur la vitesse relative d'inactivation

1.1.5. Premières conclusions

L'efficacité d'un procédé de stérilisation d'un aliment dépend donc en premier lieu :

- de la charge microbienne initiale ;
- du temps de chauffage ;
- de la température choisie.

1.1.6. Autres paramètres

1.1.6.1. Nature des micro-organismes présents dans l'aliment

EXPÉRIENCE

On détermine le temps de réduction décimale de différentes cultures de bactéries sporulées. Les conditions expérimentales sont identiques pour chaque détermination : même appareillage, même charge microbienne, même milieu, même température ambiante (121,1 °C)

RÉSULTATS

	D_{121} en minutes
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	4 à 5
<i>Clostridium sporogenes</i>	1,5
<i>Clostridium botulinum</i> (A et B).....	0,1 à 0,2
<i>Bacillus coagulans</i>	0,01 à 0,07

Les formes végétatives des levures et des moisissures, les spores de moisissures, les bactéries non sporulées (en particulier les bacilles à Gram-) sont détruites par des traitements thermiques modérés.

La résistance des spores bactériennes est sensiblement plus élevée. Ces résultats montrent qu'elle varie dans de larges proportions selon la nature de la souche.

1.1.6.2. Composition du milieu – Influence du pH

La composition du milieu dans lequel les micro-organismes sont chauffés influence leur thermorésistance. La concentration en sel, la présence de globules graisseux, sa teneur en vitamines, en acides aminés... sont autant de facteurs susceptibles de modifier la résistance des micro-organismes à la chaleur. Le facteur le plus important est cependant le pH.

EXPÉRIENCE

Des suspensions contenant 10^4 spores/L⁻³ de *Clostridium sporogenes* par mL de solutions de tampon phosphate de pH différents sont chauffées à 115 °C. On mesure pour chacune la durée maximale du chauffage permettant la survie.

On voit que la thermorésistance des bactéries sporulées est maximale en milieu neutre et diminue d'autant plus que l'on s'éloigne de la neutralité.

pH	Durée maximum de chauffage permettant la survie (en minutes)
5,0	9
5,7	12
6,0	15
6,6	21
7,0	25
7,5	20
8,2	15

1.2. Principaux procédés de traitements thermiques et leurs indications

1.2.1. Stérilisation par la chaleur

1.2.1.1. Appertisation

En 1785, un confiseur, Nicolas Appert, eut l'intuition d'un procédé de conservation qui devait révolutionner nos habitudes alimentaires, éliminer le scorbut et faire naître toute une industrie : il enferma des légumes dans des bouteilles étanches qu'il plongeait un temps prolongé dans de l'eau bouillante. L'aspect des légumes restait identique pendant plusieurs mois, leur goût était préservé. En 1801, les résultats de ses travaux furent livrés au public ; en 1803, la bonne qualité des conserves appertisées est reconnue. Appert publia en 1812 « Le livre de tous les ménages ou l'art de conserver pendant plusieurs années les substances animales et végétales ». En 1814, les bouteilles de verre sont remplacées par des boîtes en fer blanc, puis il utilise des marmites autoclaves. En 1822, Nicolas Appert reçoit le titre de « Bienfaiteur de l'humanité ». C'est en 1860 que Pasteur montrera que le procédé d'Appert détruit les microbes de l'aliment et donnera l'explication théorique de cette découverte empirique.

1.2.1.2. Définition d'une conserve appertisée

Le décret du 10 février 1955 donne la définition suivante d'une conserve appertisée : « denrée alimentaire, d'origine animale ou végétale, dont la conservation est assurée par l'emploi combiné des deux techniques suivantes :

- conditionnement dans un récipient étanche aux liquides, aux gaz et aux micro-organismes à toute température inférieure à 55 °C ;
- traitement par la chaleur ou tout autre mode autorisé. Ce traitement a pour but de détruire ou d'inhiber totalement, d'une part les enzymes de l'aliment, d'autre part les micro-organismes ou les toxines préformées dont la présence ou la prolifération pourrait altérer la denrée considérée ou la rendre impropre à la consommation humaine. »

1.2.1.3. Barèmes de stérilisation

• Le but à atteindre

Nous avons vu précédemment que les éléments microbiens les plus thermorésistants sont les spores bactériennes. Parmi les bactéries susceptibles de produire des spores, *Clostridium botulinum* est la plus redoutée.

Les aliments peu acides (viandes, poissons, légumes) peuvent contenir des spores de *Clostridium botulinum* et constituent un milieu permettant la germination des spores et la prolifération des formes végétatives.

L'expérience montre que, pour garantir le consommateur contre les risques de botulisme avec une importante marge de sécurité, le traitement thermique doit permettre de réduire de 10^{12} le nombre de spores viables présentes dans l'inoculum. En pratique, les essais sont effectués sur des spores de *Clostridium sporogenes* plus résistantes et beaucoup moins dangereuses. Un traitement thermique équivalent consiste à réduire de 10^5 le nombre de spores de *Clostridium sporogenes* viables présentes dans l'aliment.

• Relation température/durée de stérilisation

La relation entre le logarithme de la durée de stérilisation et la température est linéaire.

La température est celle obtenue au « cœur » de l'aliment.

Compte tenu de la diversité des facteurs du milieu modifiant la thermosensibilité des micro-organismes, un graphe température/durée n'est valable que pour une préparation bien déterminée.

À partir de ce graphe, il est possible de définir deux paramètres :

- la durée F, dite « valeur stérilisatrice », nécessaire pour parvenir, à la température de 121 °C, au rapport N/N_0 souhaité (10^{-5} pour *C. sporogenes*) ;
- l'augmentation de température (en °C) Z permettant d'obtenir le même résultat avec un temps de contact dix fois plus faible.

Le traitement mathématique de ces données aboutit à la formule :

$$F = t \times 10^{\frac{T-121}{Z}}$$

F étant mesurée à 121 °C, cette formule permet de calculer la durée t d'une stérilisation à une température T différente de 121 °C.

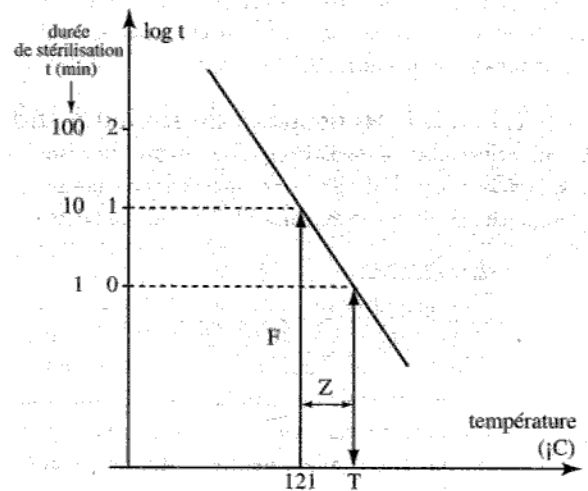


Fig. 4 – Relation température/durée de stérilisation

• Influence du conditionnement et de la nature du produit

Nous avons supposé, jusqu'à présent, que la température choisie pour le traitement thermique était atteinte instantanément.

On se rapproche de ces conditions dans le cas des liquides chauffés en couche mince (jus de fruits, lait...), on s'en éloigne quelque peu (mais l'approximation reste valable) pour des boîtes d'aliments baignant dans une phase liquide. Les conditions sont très différentes pour des masses solides compactes (pâté de viande par exemple) pour lesquelles la montée en température est lente (fig. 5).

L'équation précédente se présente alors sous forme d'intégrale:

$$F = \int_{t_1}^{t_2} 10^{\frac{T-121}{z}}$$

Sa résolution, soit par le calcul, soit graphique, soit par ordinateur, conduit à l'élaboration des barèmes de stérilisation, différents pour chaque préparation (fig. 5).

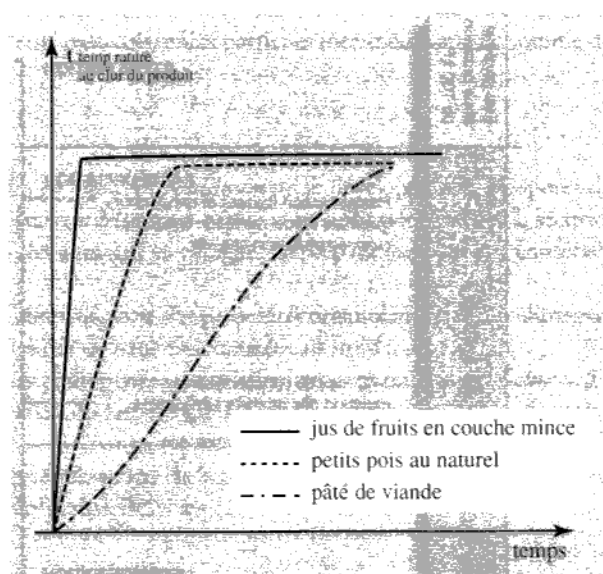


Fig. 5 – Influence de la nature du produit

• Quelques barèmes de stérilisation appliqués en pratique industrielle

Denrée	Durée en minutes	Température en °C
Haricots verts au naturel	2 à 4	121
Petits pois à l'étuvée	10 à 15	121
Sardines à l'huile	2 à 4	121
Saucisses de Francfort au naturel	3 à 4	121
Corned-beef	6 à 8	121
Champignons	6 à 10	121

Tableau 1 – Barèmes de stérilisation

1.2.1.4. Altérations microbiennes des conserves appertisées

Elles sont rares. Elles peuvent apparaître du fait d'un défaut:

- de stérilisation: le barème de stérilisation peut s'avérer insuffisant si l'aliment est fortement contaminé avant le traitement thermique, les instruments permettant le contrôle automatique de la température et son maintien pouvant être déréglés;
- d'étanchéité du conditionnement. Si l'eau baignant les récipients à stériliser n'est pas stérile, elle peut alors pénétrer dans la boîte et se trouver au contact de l'aliment.

Un défaut du serti est amplifié au moment du refroidissement des boîtes. Le contenu de la boîte est en effet alors en dépression, cet état faisant suite à l'état de surpression qui est de règle en période de chauffage. Le passage brutal de la surpression à la dépression explique qu'une action mécanique d'assez forte amplitude s'exerce à ce moment-là sur le conditionnement. C'est pourquoi, le refroidissement des boîtes est, en général, effectué dans l'eau chlorée.

Les altérations microbiennes se manifestent presque toujours par un gonflement des boîtes. Celles-ci sont polycontaminées; parmi les contaminants, se trouvent presque toujours des micro-organismes gazogènes.

Ces boîtes doivent être systématiquement éliminées.

1.2.1.5. Traitements thermiques à haute température

Les traitements thermiques, conçus selon les barèmes habituellement utilisés pour une appertisation, présentent l'inconvénient d'inactiver une proportion non négligeable de diverses vitamines.

Or, la relation température/durée est différente pour les micro-organismes et pour les vitamines. Un chauffage long à température modérée détruit les vitamines et n'est pas suffisant pour inactiver les micro-organismes. Au contraire, un traitement pendant un temps très court à haute température est suffisant pour inactiver les bactéries tout en préservant les vitamines. Ce procédé est utilisé pour la stérilisation des liquides. Le lait, par exemple, est chauffé en couche mince une à deux secondes à 140 °C-150 °C: c'est le traitement ultra haute température (UHT). Ces laits sont conditionnés aseptiquement en récipients étanches et stériles; ils peuvent être conservés plusieurs mois à la température ambiante.

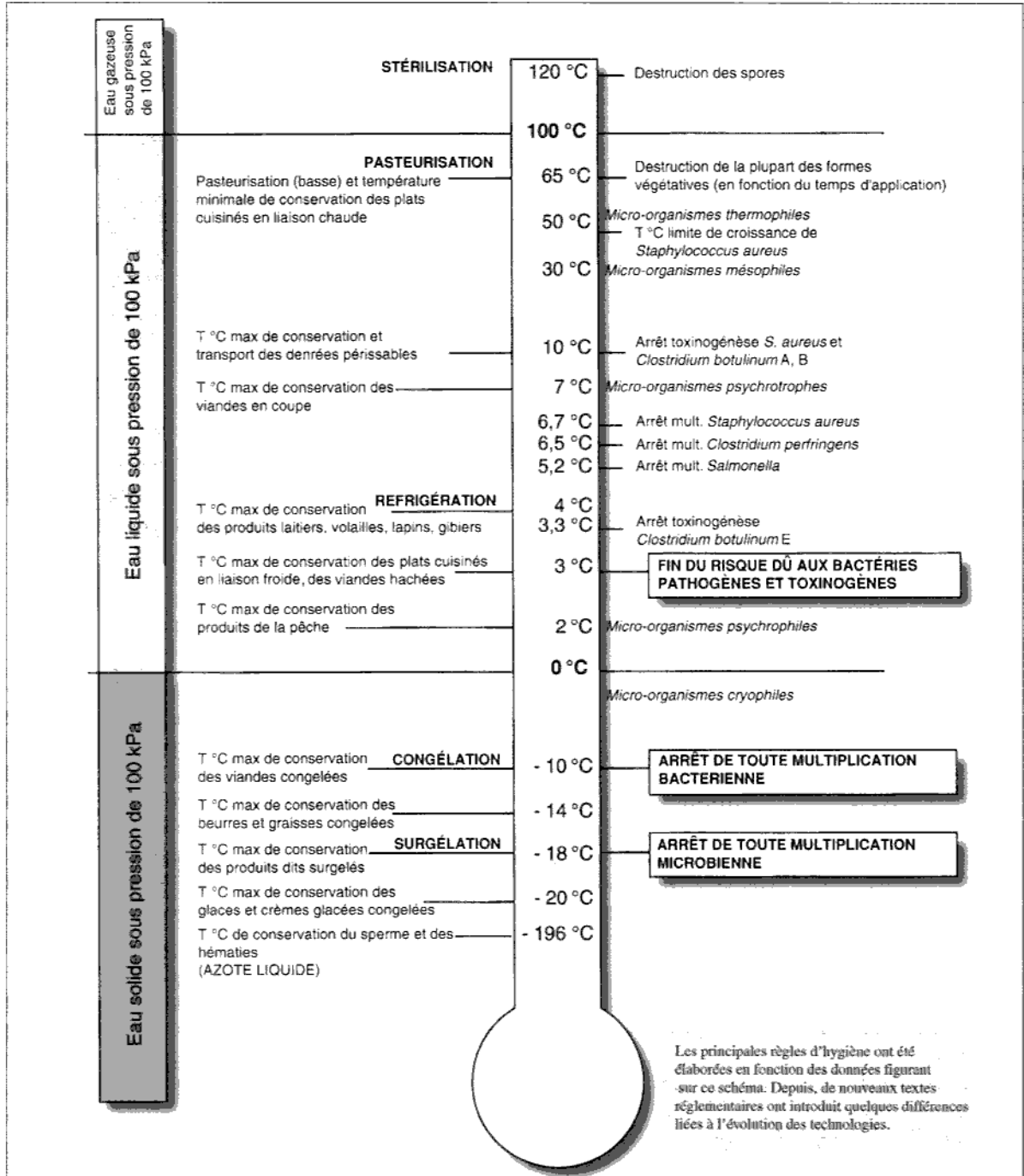


Fig. 6 – Action de la température sur les micro-organismes

1.2.2. Stabilisation des aliments par traitement thermique: la pasteurisation

La pasteurisation désigne un traitement thermique qui détruit, de manière plus ou moins totale, des éléments microbiens sous leur forme végétative.

Sous réserve que la conservation des produits pasteurisés se fasse à 3 °C, leur durée de vie est fonction de la valeur pasteurisatrice appliquée.

• Valeur pasteurisatrice

Soit T_0 la température d'essai,

D_{T_0} le temps de réduction décimale, nécessaire pour diviser par 10 le nombre de bactéries,

Z l'intervalle de température pour lequel les valeurs de D sont dans un rapport de 1 à 10 (pour la plupart des bactéries, Z est voisin de 10 °C).

Le **taux de destruction** est le nombre de divisions décimales que l'on désire obtenir à la suite d'un traitement thermique.

Le temps nécessaire pour obtenir un taux de destruction n à la température T_0 est la valeur pasteurisatrice minimale à obtenir à la fin du traitement:

$$t = n \cdot D_{T_0}$$

En utilisant les relations entre D_{T_0} et Z , il est possible, lorsque les températures varient au cours du traitement, de calculer, pour chaque température partielle, la valeur de D et donc les valeurs pasteurisatrices partielles intermédiaires. La somme de ces valeurs conduit à la valeur pasteurisatrice totale.

• Indications de la pasteurisation

La pasteurisation est indiquée dans les cas suivants :

- lorsque le pH du milieu est inférieur à 4,5. En milieu acide, en effet, *C. botulinum* ne se développe pas, les spores de *Bacillaceae* ne peuvent germer, la destruction des formes végétatives des micro-organismes suffit pour assurer la sécurité du produit. Sont concernés les conserves de fruits, de tomates, les aliments au vinaigre. La préparation peut être conservée à température ambiante ;
- dans tous les cas où un traitement thermique important entraîne une perte des propriétés organoleptiques des aliments : foie gras, jambon en boîte... Ce sont alors des semi-conserves qui doivent être stockées au froid ;
- lorsque l'objectif peut être limité à la destruction des espèces pathogènes potentiellement contaminantes : *Salmonella*, *Brucella*, Bacilles tuberculeux, *Yersinia*, *Campylobacter*. C'est le cas du lait, des crèmes glacées, du beurre, des jus de fruits. Le stockage au froid est indispensable ;
- à l'occasion de la préparation d'aliments fermentés : laits fermentés en vue de la préparation de yaourts ou de fromages. Il peut, alors, être utile de détruire une flore contaminante pouvant interférer avec le ferment lactique qui sera ensemencé dans le produit.

• Procédés de pasteurisation

Plusieurs procédés de pasteurisation existent, parmi lesquels :

- la pasteurisation basse : le produit est maintenu au moins trente minutes à 60-65 °C dans une enceinte à double paroi dans laquelle se trouve de l'eau chaude. Ce procédé a été abandonné pour le lait (il était essentiellement destiné à inactiver *Mycobacterium bovis*). Il est encore très utilisé pour les charcuteries, les corps gras, la bière et les jus de fruits ;
- la pasteurisation rapide à haute température elle consiste à chauffer l'aliment un temps très court, de quinze secondes à deux minutes, à une température élevée (70 à 90 °C). Le produit est placé entre des plaques d'acier inoxydable chauffées par un circuit d'eau chaude. L'industrie laitière recourt à ce procédé pour préparer le lait pasteurisé. On l'utilise aussi pour pasteuriser des purées de légumes, des potages. C'est une alternative à la pasteurisation basse pour tous les produits concernés par ce type de traitement.

Denrée	Température et temps nécessaire
Lait	30 min à 62 °C ou 15 s à 72 °C
Crèmes/Crèmes dessert	30 min à 71 °C ou 16 s à 20 s à 82 °C
Jus de pommes en bouteilles	30 min à 77 °C
Boissons gazeuses à base de jus de fruits	30 min à 66 °C
Bière	1 à 2 min à 82-88 °C

Tableau 2 – Barèmes de pasteurisation

Un aliment pasteurisé doit être conditionné dans un emballage étanche et conservé au froid (+4 °C).

2. Procédés de stabilisation des aliments utilisant le froid

2.1. Action de la température sur la multiplication et la toxigenèse des micro-organismes des aliments

En abaissant la température d'un aliment, on ralentit la croissance des micro-organismes qui le peuplent.

Cette influence de la température découle, en premier lieu, de la loi d'Arrhenius relative à la vitesse des réactions chimiques :

$$\log v = \frac{-A}{T} + B$$

v étant la vitesse de la réaction

A et B deux constantes

T la température en °K (degré Kelvin)

Cette relation s'applique aux réactions du métabolisme bactérien.

Elle s'applique aussi aux réactions catalysées par les enzymes d'un tissu vivant (viande, poisson, légume...).

Lorsque la température se situe en dessous du point de congélation de l'aliment, une partie de l'eau est transformée en glace, elle n'est plus mobile et n'est donc plus disponible, ni comme solvant ni comme réactif. Ces phénomènes accroissent les effets de la loi d'Arrhenius.

Par ailleurs, la congélation provoque la dénaturation de certaines enzymes bactériennes. C'est ainsi que certains bacilles à Gram- perdent leur aptitude à assimiler l'azote minéral, et requièrent pour leurs synthèses protéiques de l'azote organique sous des formes plus ou moins élaborées (peptides).

Ceci explique que l'on puisse obtenir, en dessous d'une température critique, l'arrêt de la croissance des micro-organismes. Cette température varie avec la nature du micro-organisme.

Les résultats les plus importants sont consignés sur la *figure 6*.

Notons quelques valeurs essentielles :

- en dessous de +3 °C, la multiplication des germes mésophiles et donc de la plupart des micro-organismes pathogènes est arrêtée;
- la croissance de la majorité des micro-organismes est bloquée à - 12 °C;
- à - 18 °C il n'y a plus de multiplication microbienne.

Deux procédés de stabilisation des aliments font appel au froid : la réfrigération et la congélation.

2.2. La réfrigération

Elle consiste à abaisser la température d'un aliment à des valeurs légèrement supérieures à son point de congélation.

L'intérêt de la réfrigération consiste à inhiber le développement des germes mésophiles (*figure 6*), dont la plupart des micro-organismes pathogènes.

Une réfrigération n'est donc efficace qu'à une température comprise entre 0 °C et +4 °C. À partir de 10 °C (il n'est pas rare que certaines installations commerciales ou ménagères se trouvent à cette température), l'évolution de la flore mésophile n'est que ralentie.

La réfrigération n'empêche pas le développement de certaines espèces psychrotrophes ou cryophiles; la croissance de ces populations est d'autant plus rapide que l'on s'éloigne de 0 °C dans le sens des températures croissantes. Un aliment réfrigéré dans de bonnes conditions (0 °C à 1 °C) peut être lentement altéré en surface par la flore psychrotrophe ou cryophile aérobie : *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*. Le développement de ces bactéries devient sensible au-delà de +4 °C; à 5 °C, la vitesse d'altération d'une viande est deux fois plus rapide qu'à 0 °C.

La réfrigération sélectionne donc les espèces cryophiles et ralentit le développement de leur population.

D'autre part, il faut souligner l'existence de bactéries pathogènes cryophiles : *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* et *Clostridium botulinum* E. Le nombre de toxi-infections alimentaires au cours desquelles ces bactéries sont mises en cause est croissant (exponentiel pour *Yersinia*) depuis la généralisation de la pratique de la réfrigération.

La conservation prolongée d'une denrée alimentaire et sa sécurité vis-à-vis des micro-organismes pathogènes impliquent donc :

- une réfrigération à la température la plus basse possible;
- une réfrigération continue : la chaîne du froid ne doit pas être interrompue.

C'est une méthode souvent associée à d'autres procédés de stabilisation des aliments dont les effets sont plus ou moins limités dans le temps : pasteurisation, addition d'un conservateur, traitement par des radiations ionisantes à faibles doses...

En règle générale, tout aliment ayant subi un traitement visant à le stabiliser doit être conservé entre 0 °C et +4 °C.

2.3. La congélation

2.3.1. Généralités sur la congélation

La température de fusion de la glace est de 0 °C. Au contraire, lorsqu'on refroidit de l'eau, la congélation ne débute pas à 0 °C : il existe un phénomène de surfusion.

Pendant la surfusion, des cristaux de glace s'agrègent et se désagrègent à une vitesse à peu près équivalente. Ce n'est qu'à partir d'une certaine taille qu'un cristal de glace est stable et peut servir de germe pour la croissance des cristaux.

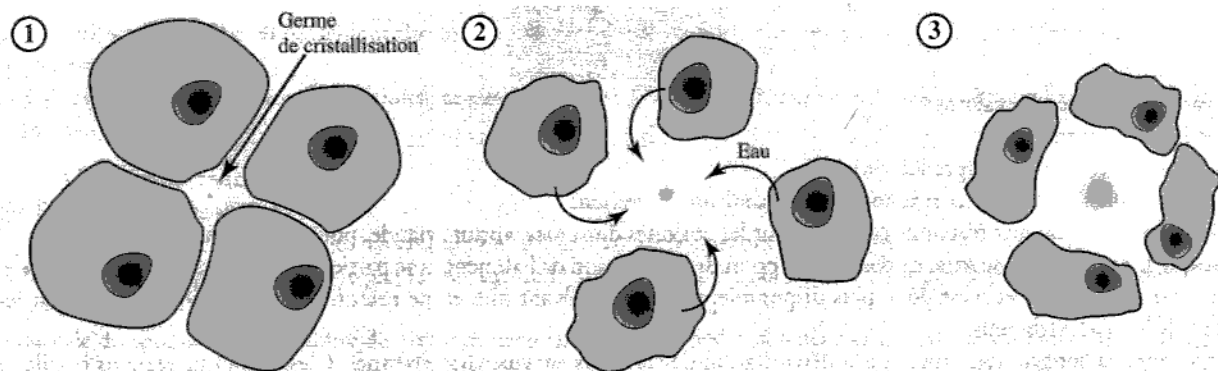


Fig. 7 – Évolution d'un tissu au cours d'une congélation lente

À une température légèrement négative, la taille critique est élevée car l'agitation thermique (qui rompt les agrégats) est encore importante. À l'opposé, aux basses températures, un petit cristal de glace est stable.

La croissance des cristaux de glace résulte de l'accolement de nouvelles molécules d'eau aux germes de cristallisation.

La dimension des cristaux de glace en fin de congélation dépend du nombre de germes cristallins : à basse température, ceux-ci sont abondants, on obtient de nombreux cristaux de petite taille. Inversement, pour une température proche du point de congélation, les germes cristallins sont peu nombreux et les cristaux obtenus de grande taille.

La congélation lente d'un tissu commence par la cristallisation de l'eau des espaces extracellulaires ①. Ce phénomène accroît leur concentration en soluté et crée, par osmose, un appel d'eau en provenance des cellules ②. Celles-ci se déshydratent, deviennent plasmolysées ③. La cristallisation reste donc, dans ce cas, essentiellement extracellulaire.

L'évolution d'un tissu soumis à une congélation rapide est sensiblement différente. Les germes de cristallisation se forment simultanément dans les compartiments extra et intracellulaires. L'augmentation de la concentration en soluté étant équivalente dans les deux secteurs, on obtient une multitude de petits cristaux également répartis.

La congélation lente est donc plus traumatisante pour un tissu, car les cristaux formés endommagent plus ou moins les membranes cellulaires.

2.3.2. Évolution de la flore microbienne de l'aliment au cours de la congélation

Une congélation bien conduite (température au cœur de l'aliment de $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) bloque à la fois la croissance des micro-organismes mésophiles, psychrotrophes et cryophiles.

On peut, en première approximation, décrire la flore microbienne d'un aliment congelé comme figée dans la structure qui était la sienne avant refroidissement. La congélation est donc un procédé de stabilisation, elle n'assainit pas un aliment pollué.

En fait, une approche plus fine montre que le processus de congélation provoque la lyse d'une partie de la population microbienne. La destruction des micro-organismes se poursuit pendant le stockage.

Toutes les espèces microbiennes ne présentent pas la même sensibilité aux basses températures. On peut distinguer, selon ce paramètre, trois groupes.

- **Les micro-organismes résistants**

Les spores bactériennes.

Les cellules végétatives des levures et des moisissures.

- **Les micro-organismes très sensibles**

Les bacilles à Gram- : *Pseudomonas*, entérobactéries (dont *Salmonella*), *Acinetobacter*, *Flavobacterium*. 1 % des *Escherichia coli* présents dans une viande survivent après six semaines de congélation à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Les formes végétatives des bacilles sporulés.

- **Les micro-organismes intermédiaires**

Ce sont les coques et bacilles à Gram+ non sporulés : staphylocoques, microcoques, streptocoques, *Lactobacillus*, corynébactéries...

Après un stockage de six semaines à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, 7 % des entérocoques survivent dans une viande.

Notons que, de façon générale, la destruction des micro-organismes est plus importante au cours d'une congélation lente que dans le cas d'une congélation rapide (les cristaux de glace, plus gros, altèrent davantage les membranes) ; que le stockage à des températures de l'ordre de $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ inactive davantage les microbes que le maintien de l'aliment à très basse température. D'autre part, la survie des germes est meilleure, pour une même température, dans un aliment neutre que dans un aliment acide.

Une certaine évolution, négative, de la flore microbienne est donc le fait de toute congélation. Son incidence est relativement faible, entre 10 % et 90 % des micro-organismes sont détruits pour l'ensemble du processus. Un aliment très pollué reste dans un état assez voisin avant et après congélation.

Signalons, enfin, que les parasites sont très sensibles au froid et détruits par la congélation. C'est le cas des formes embryonnaires des ténias et des trichines, des cysticerques de *Taenia saginata* et *Taenia solium*, des larves de trichines.

La congélation améliore, sur ce plan, la sécurité des aliments, en particulier des viandes.

2.3.3. Évolution de la flore microbienne de l'aliment au cours de la décongélation

La décongélation d'un tissu vivant s'accompagne toujours d'une exsudation. Celle-ci correspond aux liquides accumulés du fait des lésions occasionnées aux cellules par les cristaux de glace.

Au cours du processus de décongélation, les micro-organismes reprennent leur croissance en se multipliant, dans un premier temps, dans les liquides d'exsudation qui constituent un milieu particulièrement favorable. Ces liquides apparaissent, pour l'essentiel, à la surface du produit. Ce sont donc surtout des germes de surface qui se développent ; les psychrotrophes aérobies sont très actifs, les mésophiles peuvent commencer à se diviser.

L'évolution de la flore microbienne pendant la décongélation dépend de deux facteurs :

- l'importance du phénomène d'exsudation qui est lié à la vitesse de décongélation ;
- la température extérieure : plus cette température est élevée, plus le développement des micro-organismes de surface est abondant et plus la flore est diversifiée (psychrotrophes seuls à basse température, psychrotrophes + mésophiles à des températures élevées).

La décongélation des viandes peut être réalisée en tunnel climatisé (la vitesse de décongélation dépend alors de celle du renouvellement de l'air), par immersion dans l'eau renouvelée de façon continue, dans une chambre frigorifique ou dans une installation à micro-ondes.

Après la décongélation, il est important de stabiliser à nouveau le produit en le maintenant au froid (0 °C à 1 °C). Il doit être utilisé dans un délai le plus court possible.

2.3.4. Principaux procédés de congélation

La plupart des congélateurs domestiques assurent une congélation lente dont la vitesse est de l'ordre de 0,2 cm/heure.

2.3.4.1. Tunnels de congélation

La vitesse de congélation peut être sensiblement augmentée et atteindre 3cm/heure dans des tunnels où circule un air refroidi (-20 °C à -45 °C) avec une vitesse pouvant atteindre 50 km/heure. L'opération peut être rendue continue par l'utilisation d'une bande transporteuse sur laquelle les produits à congeler sont disposés, cette bande avançant dans un sens opposé au mouvement de l'air.

Dans certains cas, la bande transporteuse est perforée et l'air froid peut circuler directement au travers des denrées à congeler. Cette opération est intéressante pour des aliments tels les petits pois, les haricots verts, les pommes frites, les crevettes, dont chaque unité se présente sous un faible volume.

2.3.4.2. Congélation par contact indirect avec un fluide réfrigérant

L'aliment est immergé dans un bain liquide, lui-même en contact indirect, au moyen de tubulures, avec un fluide réfrigéré comme le fréon. Le bain liquide peut être une solution de chlorure de sodium (en concentration de 23 % elle reste liquide jusqu'à -21 °C), de chlorure de calcium (à 29,6 % elle est encore liquide à -51 °C) ou de propylène glycol (à 60 % elle est encore liquide à -51 °C).

2.3.4.3. Utilisation de liquides cryogéniques à bas point d'ébullition

C'est le cas de l'azote liquide. L'immersion directe de l'aliment dans l'azote liquide provoque l'évaporation de l'azote. La denrée qui doit fournir la chaleur de vaporisation se refroidit donc. On peut obtenir des résultats équivalents en pulvérisant l'azote liquide sur les denrées à congeler.

2.3.4.4. La surgélation

La circulaire du ministère de l'Agriculture de juillet 1953 définit un produit surgelé comme un aliment très frais ayant subi une congélation ultrarapide.

Il s'agit donc d'un cas particulier de congélation : les développements précédents s'appliquent à la surgélation. Il en est de même pour ce qui concerne les conditions de stockage.

2.3.5. Les conditions de stockage

Quel que soit le procédé utilisé pour congeler un aliment, la qualité du produit est limitée par les conditions de stockage.

La congélation dans l'azote liquide, par exemple, apporte un « plus » car sa vitesse est très élevée. Ce procédé présente le double avantage de maintenir à l'aliment ses qualités d'origine et d'occasionner, à la décongélation, une exsudation de très faible amplitude.

Ces gains ne seront cependant maintenus que si le produit est entreposé entre -23 °C et -30 °C. Ils sont annulés par un stockage à des températures supérieures.

3. Conservation des aliments par déshydratation

3.1. Principe - Principales indications

Le séchage des aliments à l'air (au soleil ou à l'ombre) est un des procédés les plus anciens et les plus répandus de conservation des aliments. Il est encore pratiqué pour de nombreuses denrées dans la plupart des pays de l'hémisphère sud. Sous nos climats, sont ainsi conservés : les figues, les pruneaux, certains champignons... D'autres produits sont aussi traités aujourd'hui par les techniques modernes de déshydratation : le lait, le café, la purée de pommes de terre, les potages, certaines préparations culinaires, des aliments pour animaux...

Il faut bien distinguer séchage et déshydratation. Au cours du séchage, on élimine l'eau libre et une partie de l'eau liée. En déshydratant un aliment, on prélève la plus grande partie de son eau liée : l'activité de l'eau A_w du produit atteint des valeurs suffisamment basses pour interdire le développement de tous les micro-organismes, même les plus osmophiles.

Pour obtenir la vaporisation de l'eau, il faut fournir, sous forme de chaleur, l'énergie nécessaire pour rompre les liaisons unissant l'eau à l'aliment et celles unissant, à l'état liquide, les molécules d'eau entre elles. Un chauffage plus ou moins important est donc indispensable, il peut contribuer à la destruction des micro-organismes présents dans et sur l'aliment.

3.2. Principaux procédés de déshydratation

3.2.1. Séchage par l'air

Il existe des tunnels de déshydratation comparables aux tunnels employés pour la congélation. Les aliments sont soumis à un courant d'air chaud et sec. L'air est à la fois la source de chaleur (par convection) et le véhicule permettant l'élimination de la vapeur d'eau.

Un cas particulier intéressant est l'**atomisation** : l'aliment est pulvérisé dans un courant d'air chaud et sec. Il en résulte la formation très rapide de fines particules qui sont ensuite rassemblées.

Les poudres instantanées sont obtenues en humidifiant légèrement, sous agitation, des particules résultant d'une atomisation.

3.2.2. Séchage sous vide

L'évaporation est facilitée : à pression réduite, la quantité de chaleur à fournir est moindre, l'opération plus rapide et moins onéreuse. La chaleur peut être apportée par rayonnement, et la vapeur d'eau éliminée, par condensation, à l'état liquide.

3.2.3. Lyophilisation

L'aliment est d'abord congelé puis placé à pression réduite et chauffé. L'eau passe directement de l'état solide à l'état de vapeur (sublimation). Ce procédé préserve particulièrement bien les propriétés et la structure de l'aliment.

3.3. Évolution des flores microbiennes

Dans un produit déshydraté, une forte proportion de micro-organismes ont perdu leur vitalité. Seules les spores et quelques formes végétatives persistent. La stabilité et la sécurité du produit sont donc notablement améliorées. En fait le principal problème, sur le plan de l'hygiène, provient des contaminations qui peuvent affecter le produit pendant et après le traitement. Il faut donc surveiller la qualité bactériologique de l'air pulsé dans les séchoirs : on trouve dans l'air des spores de la plupart des espèces de *Clostridium*. Les ateliers de conditionnement sont aussi régulièrement désinfectés car les bactéries thermophiles et osmophiles y sont sélectionnées.

4. Stabilisation des aliments par traitements chimiques – Les conservateurs

4.1. Définition

Un conservateur est un additif incorporé à un aliment dans le but de ralentir l'évolution de sa flore microbienne. Il s'agit, en général, de composés utilisés à faibles doses afin d'éviter tout risque d'ordre toxicologique. La plupart ne sont, dans ces conditions, que bactériostatiques.

4.2. Les principaux conservateurs : propriétés, indications

4.2.1. Les conservateurs de nature minérale

4.2.1.1. Le chlorure de sodium, le « sel »

À des concentrations suffisantes, le chlorure de sodium possède des propriétés inhibitrices sur de nombreux micro-organismes, en particulier sur les bacilles à Gram-. Seuls les micro-organismes halophiles peuvent se développer dans un aliment salé. Ils peuvent être responsables d'altérations de salaisons, mais leur développement est recherché pour certains produits nécessitant une maturation comme la saucisse fraîche (maturation limitée) ou les saucissons secs (maturation plus importante).

La salaison est un des procédés de conservation des produits de charcuterie. Ceux-ci sont immergés dans la saumure ; une solution saline peut être aussi injectée.

Les salaisons (viandes salées, charcuterie) peuvent cependant héberger *Clostridium botulinum*. Elles furent souvent, dans le passé, mises en cause dans des cas de botulisme.

4.2.1.2. Nitrates, nitrites

Une concentration suffisante en nitrates ou nitrites (de sodium ou de potassium) inhibe le développement de *Clostridium botulinum* et la production de sa toxine. Les cas de botulisme sont devenus rares depuis que l'on a recours à cet additif.

L'action inhibitrice est due aux nitrites. Les nitrates sont actifs du fait de leur réduction en nitrites par les bactéries possédant une nitrate-réductase.

L'emploi de nitrites est donc généralement couplé à celui du sel dans les salaisons. Il n'est pas sans inconvénients : au cours de la cuisson et, à un degré moindre, dans le tube digestif, les nitrites réagissent avec les acides aminés pour former des nitrosamines dont les propriétés cancérogènes sont démontrées.

Il faut cependant relativiser l'incidence de cet additif car les nitrites absorbés en tant que tels sont peu abondants en comparaison de ceux provenant de l'alimentation : les légumes et les viandes contiennent de plus en plus de nitrates ou de nitrites du fait de l'emploi généralisé d'engrais minéraux. Il y a d'autres sources de nitrosamines, par exemple : fumées de tabac, cuisson des viandes au « barbecue ».

4.2.1.3. L'anhydride sulfureux et les sulfites

Leur emploi est très répandu en œnologie. Ces composés inhibent de nombreuses bactéries et moisissures ; les levures sont plus résistantes.

Ils sont employés pour la conservation de diverses préparations à base de jus de fruits, pêches, tomates pelées, concentrés de fruits, noix, fruits secs, morue salée, moutardes...

La consommation d'anhydride sulfureux n'est pas sans effets secondaires : les céphalées et les malaises ressentis quelquefois après une absorption exagérée de vin blanc lui sont en général imputés.

4.2.2. Les conservateurs de nature organique

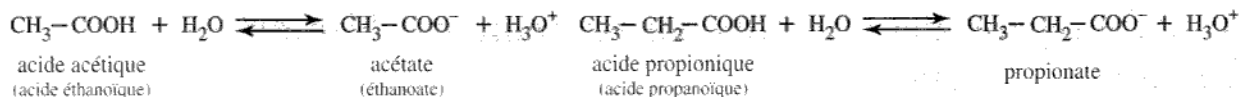
4.2.2.1. Les acides organiques

• Les acides organiques saturés

Les acides organiques exercent un effet inhibiteur sur la croissance des micro-organismes :

- par l'acidification de l'aliment qui résulte de leur addition et qui est préjudiciable à de nombreux germes. C'est ainsi que l'acide acétique est utilisé pour conserver les oignons, les cornichons, le poisson dans les marinades. L'utilisation de l'acide acétique comme agent conservateur est généralement couplée avec d'autres procédés de conservation ou de stabilisation : pasteurisation, réfrigération, présence d'autres additifs ;
- du fait de l'action inhibitrice de leur forme ionisée. L'anion est très actif contre les moisissures. C'est le cas de l'acide propionique et de ses sels qui sont utilisés pour allonger la durée de conservation de produits à base de céréales comme le pain de mie. L'acide propionique peut être ajouté dans la pâte à pain car il n'a aucune action sur les levures. On peut préserver des fruits ou des légumes, contre les attaques de moisissures, en les plongeant dans un bain d'acide propionique ou de propionate.

Ces composés sont dépourvus de toxicité.



• Les acides organiques insaturés

La présence d'une double liaison accroît l'activité antimicrobienne des acides organiques.

Le principal représentant de ce groupe est l'**acide sorbique** et ses sels de potassium, de sodium ou de calcium.

L'acide sorbique est un **anti-moisissure** très efficace. Son action s'étend, à un degré moindre, aux levures et aux bactéries sporulées dont *C. botulinum*.

Il est utilisé pour conserver les corps gras (beurre, margarine, mayonnaise), des jus de fruits, des produits de boulangerie, des pâtisseries, les olives de table, les châtaignes, les pruneaux secs.

Dans les produits de boulangerie, on introduit de préférence dans la pâte du palmitate de sorbyle. Ce composé libère l'acide sorbique au cours de la cuisson quand la levée de la pâte est terminée. On évite ainsi l'action inhibitrice de l'acide sorbique sur les levures.

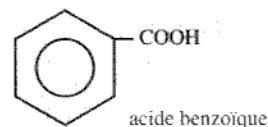
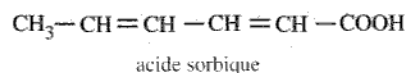
Son antagonisme vis-à-vis de *C. botulinum* devrait être exploité. C'est un des rares composés susceptibles de remplacer les nitrites. Il n'est pas toxique, du moins aux doses employées.

• L'acide benzoïque et ses dérivés

Contrairement aux précédents, l'acide benzoïque sous sa forme ionisée (donc en milieu acide) est surtout actif contre les bactéries et les levures ; son action inhibitrice sur les moisissures est moins prononcée.

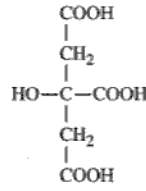
Certains de ses dérivés : esters de l'acide paraaminobenzoïque, sont actifs dans les milieux proches de la neutralité.

L'acide benzoïque, ses sels, ses dérivés trouvent leur utilisation dans la conservation des jus de fruits, des compotes, des œufs de poissons...

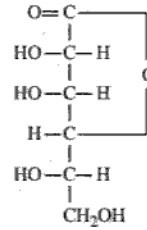


• D'autres acides organiques

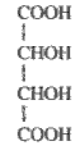
Les propriétés bactériostatiques de l'acide citrique, de l'acide ascorbique, de l'acide tartrique sont utilisées dans de nombreux produits. Citons aussi l'acide lactique, conservateur naturel des aliments subissant une fermentation lactique: choucroute, saucisson, yaourts...



acide citrique



acide ascorbique



acide tartrique

4.2.2.2. Les composés à noyau phénolique

Le spectre de leurs propriétés antimicrobiennes est très étendu (bactéries, levures, moisissures et même certains virus) mais l'activité de ces molécules est faible.

Leur intérêt réside dans le fait qu'ils potentialisent l'action d'autres conservateurs comme l'acide sorbique et qu'ils sont utilisés également pour leurs propriétés antioxydantes: ce sont donc des additifs à fonctions multiples.

Certains sont actifs sur *Clostridium botulinum* et leur association avec l'acide sorbique est, sur ce plan, prometteuse.

Les acides hydrocinnamiques sont inhibiteurs des *Pseudomonas*, ce qui peut les rendre utiles pour prévenir l'altération de nombreuses denrées par un traitement en surface.

4.3. Pour une bonne utilisation des conservateurs

L'addition de conservateurs stabilise un aliment pendant une période plus ou moins longue. La flore microbienne continue son évolution, lentement pour les espèces sensibles, plus rapidement pour les espèces résistantes qui sont sélectionnées par le traitement. Des résultats appréciables peuvent être obtenus par ce procédé. Cela suppose:

- le **bon choix** d'un conservateur; il est fonction de l'aliment et de la structure de sa flore microbienne;
- l'**association de plusieurs conservateurs** qui permet d'élargir le spectre d'activité de chacun et d'utiliser les synergies qui peuvent exister entre différentes molécules;
- le **couplage avec d'autres procédés de stabilisation** (en général, réfrigération ou déshydratation).

5. Traitements par rayonnements ionisants

5.1. Définitions

L'irradiation des denrées alimentaires consiste, dans le but d'accroître leur durée de conservation et (ou) d'améliorer leurs qualités hygiéniques, à les exposer à l'action directe de rayonnements de haute énergie:

- photons de courte longueur d'onde;
- électrons accélérés.

Selon la dose appliquée, trois objectifs peuvent être recherchés.

• La radurisation

La dose de radiations est la plus élevée n'altérant pas l'aliment. Elle en réduit sensiblement la charge microbienne. L'objectif est d'augmenter la durée de vie des produits frais. Ce traitement peut s'appliquer aux denrées emballées.

Les doses sont en général comprises entre 1 et 5 kGy (kilo Gray).

• La radication

La dose de radiations appliquée est suffisante pour éliminer les bactéries pathogènes et la flore d'altération, à l'exception des bactéries sporulées. C'est l'équivalent d'une pasteurisation. Les doses employées sont inférieures à 10 kGy.

• La radappertisation

C'est la stérilisation de l'aliment par irradiation. Les doses nécessaires sont comprises entre 20 et 50 kGy.

LES UNITÉS DE MESURE

UNITÉ DE DOSE DE RAYONNEMENT IONISANT

L'unité absorbée est le gray (Gy) qui correspond à l'absorption d'une énergie de un joule par kilogramme d'aliment irradié. L'ancienne unité, en vigueur avant 1975, était le rad

$$1 \text{ rad} = 10^{-2} \text{ Gy} = 10^{-2} \text{ J/kg}$$

UNITÉS D'ÉNERGIE

En physique atomique, l'énergie est exprimée en électrons/volt (eV). C'est l'énergie acquise par un électron accéléré par une différence de potentiel de un volt.

1 méga électron volt = 1 MeV = 10^6 eV = $4,45 \times 10^{-20}$ kWh

UNITÉS D'ACTIVITÉ NUCLÉAIRE

L'ancienne unité était le curie; un curie correspond à l'activité de un gramme de radium: $3,7 \times 10^{10}$ désintégrations par seconde. L'unité actuelle est le becquerel (Bq)

1 curie = $3,7 \times 10^{10}$ Bq

Le becquerel mesure donc l'activité de la quantité de radionucléides donnant une désintégration par seconde.

5.2. Nature, propriétés et indications des radiations ionisantes utilisées**5.2.1. Les rayons gamma (γ)**

Les rayons γ sont un flux de photons, il s'agit donc de radiations électromagnétiques de même nature que la lumière mais de longueur d'onde plus courte, donc d'énergie plus élevée.

Rappelons la loi de Planck:

$$W = \frac{hc}{\lambda}$$

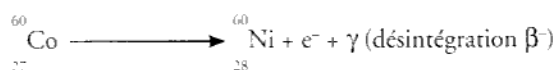
W: énergie du photon

c: vitesse de la lumière

λ : longueur d'onde de la radiation

h: constante de Planck

Ils sont obtenus en bombardant du cobalt 59 par les neutrons d'une pile atomique: il se forme du cobalt 60. Celui-ci se désintègre spontanément avec émission de rayons γ :



Les photons produits par le cobalt 60 ont une énergie de 1,33 et 1,17 MeV.

Ces rayonnements sont très pénétrants: une dizaine de centimètres lorsque l'aliment n'est pas trop dense.

La radioactivité du cobalt 60 diminue de 1 % par mois.

5.2.2. Les électrons accélérés

Ils sont produits dans des appareils dont la puissance ne permet pas de leur fournir une énergie supérieure à 10 MeV. Ils sont focalisés sous forme d'un faisceau dirigé sur l'aliment à irradier.

L'utilisation d'électrons accélérés présente les avantages suivants:

- l'arrêt de leur production est facile, il suffit de couper le dispositif d'alimentation électrique de l'accélérateur: sécurité d'emploi;
- le faisceau peut être dirigé: souplesse d'utilisation;
- le traitement est court.

Cependant, les électrons sont peu pénétrants et leur usage est limité à des traitements de surface.

5.3. Les dispositifs: irradiateurs γ et irradiateurs à e^{-}

Les installations industrielles qui permettent d'irradier les aliments comportent une pièce dans laquelle est implantée la source de rayonnement: cobalt ou accélérateur d'électrons. Cette chambre d'irradiation est fermée par des murs en béton dont l'épaisseur (1,50 m à 2 m) absorbe l'énergie des rayonnements et protège ainsi le personnel à l'extérieur. Un circuit permet d'introduire en continu les aliments et de les évacuer après leur traitement. Pour permettre au personnel de pénétrer dans la chambre, il suffit de plonger la source de cobalt au fond d'une piscine d'eau ou de couper l'alimentation électrique de l'accélérateur d'électrons.

5.4. Mécanisme d'action des rayonnements ionisants

Sous l'action d'un rayonnement de haute énergie, les molécules des aliments sont transformées: elles perdent un électron de surface et se transforment en ions. L'ionisation de l'eau joue dans le processus le rôle essentiel. Elle aboutit à des ions $\text{H}_2\text{O}^{\bullet}$ qui se décomposent à leur tour en ions H^{\bullet} et en radical hydroxyle $[\text{OH}]^{\bullet}$. Ces derniers sont très réactifs et réagissent avec les différents constituants de l'aliment en les transformant en radicaux libres dont les recombinaisons peuvent redonner les produits de départ (fig. 8) ou, au contraire, déboucher sur des transformations importantes et définitives, cas des lipides (fig. 9).

5.4.1. Action sur les glucides (fig. 8)

Les glucides ne sont pratiquement pas modifiés par les rayonnements ionisants. Les radicaux libres produits se recombinaient avec les électrons et les ions H^+ disponibles pour redonner le composé de départ.

Diverses recombinaisons de type G – G sont possibles mais leur incidence est faible. D'une façon générale, les glucides sont moins altérés que par un traitement thermique.

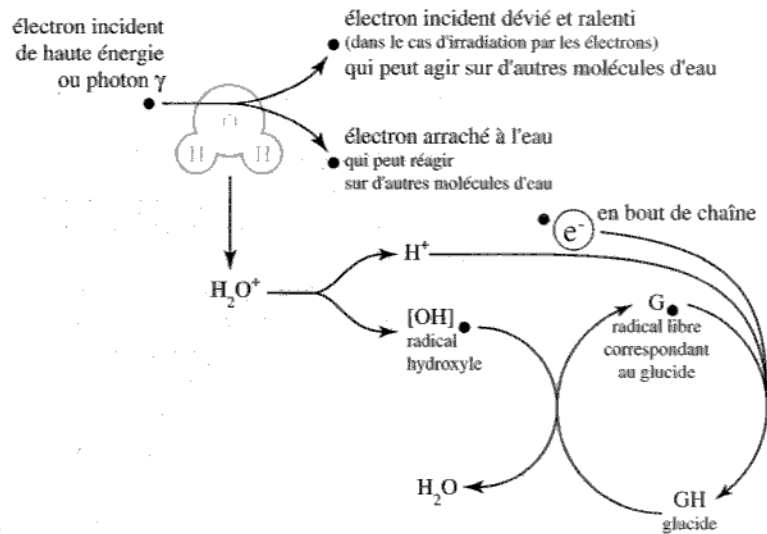


Fig. 8 – Action des rayonnements ionisants sur les glucides

5.4.2. Action sur les protéines

Le traitement n'entraîne pas de modifications importantes des molécules. Le mécanisme est comparable à celui décrit pour les glucides.

Il peut cependant se former des quantités détectables d'hydrogène sulfuré. L'action des rayonnements de haute énergie confère alors aux aliments une « saveur d'irradiation », la viande a un léger goût de caramel à partir de certaines doses. Le stockage et la cuisson du produit font disparaître en grande partie ces saveurs indésirables. D'autre part, certains procédés réduisent ces inconvénients, notamment l'irradiation de produits alimentaires congelés ou emballés sous atmosphère d'azote. La valeur nutritive des protéines irradiées est tout à fait comparable à celle d'aliments traités par d'autres procédés.

5.4.3. Action sur les lipides (fig. 9)

L'action d'un radical hydroxyle sur un lipide (schématiquement LH) aboutit à la production d'un radical L•. En fixant l'oxygène, ce dernier engendre un radical oxydé très réactif capable de capter un atome d'hydrogène d'une autre molécule lipidique, régénérant ainsi le radical L• consommé et donnant un hydroperoxyde qui s'accumule. La présence d'hydroperoxydes lipidiques est indésirable car elle confère à l'aliment le goût et l'odeur caractéristiques du rancissement. Le procédé n'est donc pas applicable aux aliments riches en lipides traités à l'air libre.

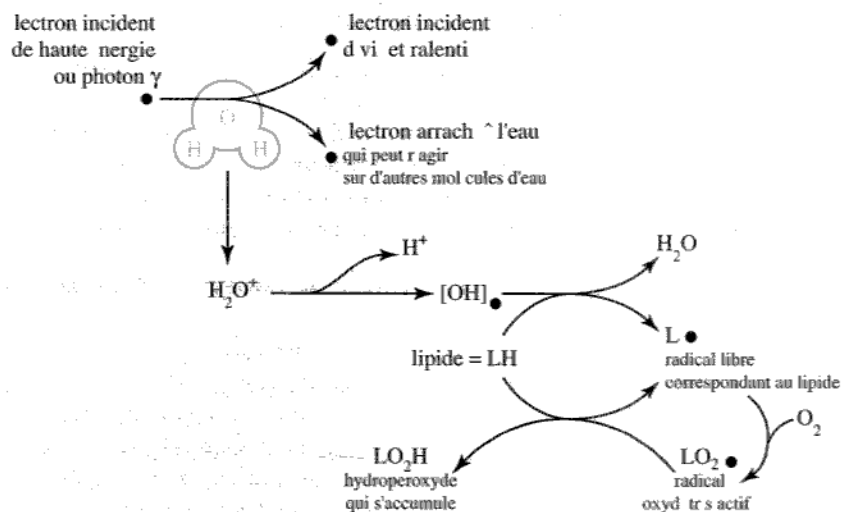


Fig. 9 – Action des rayonnements ionisants sur les lipides

5.4.4. Action sur l'ADN

L'effet des rayonnements ionisants sur l'ADN est considérable. Des transformations importantes sont obtenues soit par action directe du rayonnement, soit par celle des radicaux hydroxyles issus de la radiolyse de l'eau.

Un des brins de l'ADN peut être rompu, des pontages anormaux apparaissent entre les bases, celles-ci peuvent être hydratées.

Ces déformations rendent impossible l'association des bases complémentaires et, par conséquent, l'association des brins, leur duplication et leur réplication. L'ADN est devenu non fonctionnel. La cellule ne peut ni se diviser, ni croître. Ces modifications ne sont pas ressenties au niveau des qualités organoleptiques de l'aliment. Par contre, de par son action sur l'ADN, l'irradiation a pour effet de détruire toute forme de vie au sein de la denrée traitée (micro-organismes, parasites) et toute possibilité de maturation et de croissance.

L'action sur l'ADN est à la base des applications des traitements ionisants dans l'industrie agro-alimentaire : désinsectisation, stérilisation ou stabilisation d'un aliment, arrêt de la maturation des fruits, de la germination des pommes de terre, des oignons...

5.5. Applications et réglementation

5.5.1. Les aliments irradiés peuvent-ils être radioactifs ?

Des noyaux stables (ce qui est le cas des atomes constituant un aliment) ne peuvent devenir radioactifs (c'est-à-dire émettre des rayonnements β^- , β^+ , α ou γ) que s'ils sont déstabilisés par la rencontre d'une particule de très haute énergie. Il faudra plus d'énergie à un électron qu'à un photon pour y parvenir, car l'électron devra, pour atteindre le noyau, traverser le nuage électronique qui l'entoure et sera ralenti par l'effet répulseur des électrons de l'atome irradié.

Le seuil d'activation d'un noyau (quantité minimum d'énergie pour le déstabiliser) est variable selon l'élément. Les valeurs sont de 18,7 MeV pour l'atome de carbone, 16,3 MeV pour celui d'oxygène, 10,6 MeV pour l'azote et 12,4 MeV pour le phosphore.

Or, les électrons accélérés sont produits dans des appareils dans lesquels leur énergie ne dépasse pas 10 MeV (songeons qu'ils perdent une partie de cette énergie en traversant le nuage électronique). Les photons γ produits par le cobalt 60 ont, rappelons-le, une énergie de 1,17 MeV pour certains et 1,33 MeV pour d'autres.

La marge de sécurité est donc considérable.

5.5.2. L'irradiation conduit-elle à des produits toxiques ?

Avant d'introduire cette nouvelle technique, il a été nécessaire de s'assurer qu'elle ne présentait pas de risques d'ordre toxicologique. Cette étude a été conduite au niveau international et les résultats examinés par un comité tripartite d'experts (Agence internationale de l'énergie atomique, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Organisation mondiale de la santé).

En 1980, ces experts sont parvenus à la conclusion que l'irradiation de n'importe quelle denrée jusqu'à une dose moyenne de 10 kGy n'entraîne aucun risque toxicologique. Ces mêmes experts ont établi, par ailleurs, que les aliments irradiés ne posaient pas de problème nutritionnel ou microbiologique.

Le Comité International pour la microbiologie et l'hygiène reprenant toutes ces données aboutit aux mêmes conclusions, tout en précisant qu'il n'existe aucune différence qualitative entre les mutations provoquées par l'irradiation et celles engendrées par d'autres procédés de conservation (chaleur ou dessiccation sous vide).

La dose maximale de 10 kGy a donc été retenue. Elle est suffisante pour la plupart des traitements.

5.5.3. Un vaste champ d'applications

5.5.3.1. Conservation des grains, des fruits et légumes secs

Le traitement de ces denrées par les rayonnements ionisants représente un progrès appréciable. En effet, 1/4 à 1/8 de la production mondiale est détruite du fait de l'activité de rongeurs, d'insectes et de micro-organismes ; de plus, certaines substances chimiques utilisées pour faire face aux dégradations présentent un risque toxique non négligeable : c'est le cas de l'oxyde d'éthylène utilisé en fumigations pour désinfecter les céréales, du bromure de méthyl toléré en France pour traiter les légumes secs... Les doses de rayonnements ionisants suffisantes pour les remplacer sont très faibles : 0,4 à 1 kGy.

5.5.3.2. Allongement de la durée de conservation des fruits et légumes frais

Il est obtenu par :

- la destruction des micro-organismes responsables d'altérations ;
- l'arrêt de la synthèse des enzymes intervenant dans la maturation ou la croissance.

Le traitement des produits frais est associé à la réfrigération. On peut conserver un mois à + 4 °C des fraises irradiées (elles sont cependant moins fermes). L'irradiation retarde la maturation des champignons, des bananes ; elle est d'un grand intérêt pour tous les produits frais dont le délai d'acheminement est important : fruits exotiques, primeurs...

De faibles doses de rayonnements sont suffisantes pour inhiber la germination des pommes de terre, des oignons, de l'ail.

5.5.3.3. Conservation et meilleure hygiène des viandes et poissons

L'ionisation peut être appliquée aux viandes peu grasses et aux poissons. L'intérêt est double :

- prolonger la durée de conservation (d'une semaine pour le poisson frais) en détruisant la flore d'altération ;
- améliorer la sécurité du produit en détruisant les parasites et les micro-organismes pathogènes.

Aliments	Objectif du traitement	Doses appliquées en kGy
Bulbes et tubercules : pommes de terre, oignons, ail, échalotes...	Empêcher la germination pendant le stockage.	0,05 à 0,15
Céréales	Désinsectisation.	0,20 à 0,40
Fruits et légumes secs : noix, châtaignes, noisettes, raisins secs... lentilles, pois, haricots secs...	Désinsectisation.	0,40 à 1
Fruits et légumes frais : fraises et autres fruits rouges, mangues, fruits exotiques, champignons, asperges, endives, légumes découpés préemballés...	<ul style="list-style-type: none"> - Allonger la durée de conservation en inhibant la maturation par l'arrêt de la synthèse des enzymes intervenant dans la maturation et par la destruction des micro-organismes d'altération. - Remplacer les traitements chimiques. 	0,70 à 2,5
Viandes, poissons, mollusques et crustacés frais ou congelés	<ul style="list-style-type: none"> - Allonger la durée de conservation en détruisant partiellement la flore d'altération. - Éliminer tous les germes pathogènes non sporulés. 	0,80 à 3,50 2 à 4
Épices et aromates, légumes déshydratés, amidon, gélatine, colorants	<ul style="list-style-type: none"> - Améliorer la sécurité bactériologique. - Remplacer les traitements par l'oxyde d'éthylène. 	
Emballages alimentaires	Stérilisation.	10 à 50

Tableau 3 – Applications des propriétés des rayonnements ionisants dans les industries agro-alimentaires

5.5.3.4. Le traitement par les rayonnements ionisants peut être couplé avec d'autres procédés de conservation

Dans les cas de produits de charcuterie, il permet de diminuer la quantité de nitrates ajoutée à l'aliment. L'ionisation des produits surgelés améliore leur sécurité en détruisant les micro-organismes qui survivent « en hibernation ». L'association ionisation/chaleur peut, enfin, être envisagée avec profit. En abaissant la charge bactérienne de la denrée à stériliser, un traitement préalable aux rayonnements ionisants doit permettre de diminuer la température ou (et) la durée du chauffage auquel elle est soumise en vue de son appertisation. Les qualités organoleptiques et nutritionnelles des conserves pourraient en être améliorées.

6. Conservation sous atmosphère modifiée enrichie en dioxyde de carbone

6.1. Principe

On peut allonger la durée de conservation d'un produit alimentaire, en particulier d'un produit frais (viande, poisson, légume), en le plaçant dans un emballage ou, plus généralement pour les grandes quantités, en le conditionnant sous vide ou sous une atmosphère à forte pression partielle en CO_2 (exemple 80 % N_2 et 20 % CO_2).

6.1.1. Conditionnement sous vide

Un produit alimentaire conditionné sous vide évolue, dans un premier temps, en aérobiose. En effet, le vide n'est jamais assez poussé pour éliminer totalement l'oxygène. Une pression partielle en oxygène équivalant à 1 % de la pression atmosphérique maintient suffisamment d'oxygène pour saturer les enzymes respiratoires.

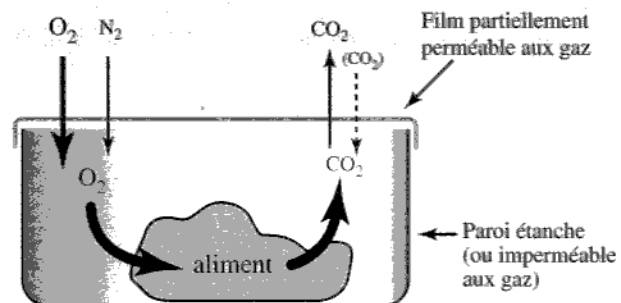
D'autre part, l'oxygène pénètre à travers le film de l'emballage à une vitesse qui varie en fonction de la perméabilité du film à ce gaz. Le tissu et les micro-organismes qui l'habitent consomment de l'oxygène et produisent du dioxyde de carbone.

La composition de l'atmosphère entourant l'aliment après une certaine durée de stockage est donc fonction de la perméabilité à l'oxygène de l'emballage, mais aussi de la nature de l'aliment qui respire plus ou moins intensément.

On peut envisager trois possibilités d'évolution.

- L'aliment consomme plus d'oxygène qu'il n'en reçoit et rejette plus de dioxyde de carbone qu'il n'en sort de l'emballage.

L'atmosphère sous le conditionnement devient anaérobie à forte pression partielle en CO_2 . On obtient un mélange N_2/CO_2 . L'accumulation de CO_2 peut entraîner une légère surpression.

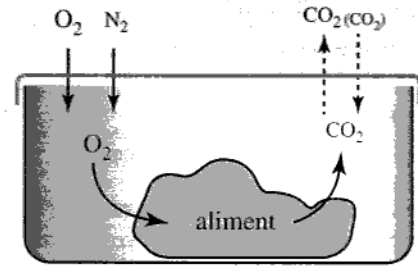


• **L'aliment consomme autant d'oxygène qu'il en reçoit.**

La pression partielle en oxygène n'évolue pas et reste faible. Par contre, la perméabilité du film au CO₂ est, en général, moindre que celle à l'oxygène. L'atmosphère s'enrichit donc en dioxyde de carbone et en azote.

• **L'aliment consomme moins d'oxygène qu'il n'en reçoit.**

L'atmosphère tend vers une composition voisine de celle de l'air mais plus riche en dioxyde de carbone.



On notera que, dans tous les cas de figure, l'atmosphère au contact de l'aliment présente une pression partielle en CO₂ élevée.

6.1.2. Conditionnement sous atmosphère modifiée par réinjection de gaz et sous atmosphère contrôlée

Les proportions généralement choisies sont 80 % de N₂ et 20 % de CO₂.

6.2. Effets sur la flore microbienne

Le taux de croissance de nombreuses espèces microbiennes est notablement diminué dans une atmosphère à forte pression partielle en dioxyde de carbone.

Des chercheurs américains ont comparé la conservation, à l'air et sous CO₂ pur, de poissons frais placés à deux températures différentes: 0 °C et 15 °C.

Le temps mis par la flore totale pour atteindre 10⁷ micro-organismes revivifiables par gramme est de un à sept jours pour 15 °C et 0 °C à l'air, de trois à trente-trois jours dans les mêmes conditions sous CO₂.

L'inhibition par le CO₂ est proportionnellement plus importante au froid. Le froid potentialise donc l'effet du CO₂.

L'étude séparée de la croissance de différentes espèces à l'air et sous CO₂ montre que les micro-organismes les plus sensibles au CO₂ sont *Pseudomonas*, *Achromobacter* et, plus généralement, ceux de la flore psychrotrophe d'altération, à un degré moindre les moisissures.

Les bactéries lactiques sont parmi les moins sensibles. Certains micro-organismes pathogènes sont partiellement inhibés (*Salmonella*), quelques espèces, au contraire, prolifèrent mieux (*Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*), d'autres sont indifférentes (*Clostridium*, staphylocoques).

L'intérêt de l'emballage sous atmosphère modifiée et enrichie en CO₂ est donc surtout de ralentir le processus d'altération par les bactéries psychrotrophes aérobies.

Ce procédé est surtout employé pour allonger la durée de conservation des viandes fraîches réfrigérées et des produits de la mer. On y recourt aussi pour les ovoproduits et les légumes.

6.3. Mécanisme d'action du CO₂

On a pensé, dans un premier temps, que l'inhibition des germes psychrotrophes aérobies placés sous vide était une conséquence de la faible pression partielle en oxygène. On a vu qu'il n'en était rien.

En fait, le dioxyde de carbone possède une action bactériostatique sélective qui lui est propre. C'est un véritable additif conservateur gazeux.

Il agit en abaissant le pH de la denrée du fait de sa solubilisation :



Là n'est pourtant pas l'essentiel. Le dioxyde de carbone a une action directe sur les micro-organismes sensibles, sans doute en perturbant l'activité de certaines enzymes. Son mode d'action exact n'est pas encore bien connu.

Hygiène alimentaire appliquée à la restauration collective

CHAPITRE VII - Les bases réglementaires de l'hygiène des
aliments

CHAPITRE VIII - Éviter les apports microbiens

CHAPITRE IX - Limiter la multiplication des germes :
hygiène des préparations et des transports

CHAPITRE X - Produits de nettoyage et de désinfection

CHAPITRE XI - L'analyse microbiologique des aliments

CHAPITRE VII

LES BASES RÉGLEMENTAIRES DE L'HYGIÈNE DES ALIMENTS

La restauration collective dans les établissements scolaires, les restaurants d'entreprises ou d'administrations, les hôpitaux, les foyers pour personnes âgées, les transports aériens ou ferroviaires représentait, en 2004, en France, plus de 4,3 milliards de repas, soit environ 11 millions de repas par jour. On estime à 5 millions le nombre de Français prenant au moins une fois par jour leur repas en restauration collective.

Son extension a coïncidé avec l'augmentation du nombre de toxi-infections alimentaires (nombre de foyers, nombre de malades). L'importance de l'hygiène en restauration collective est particulière du fait qu'un aliment contaminé par des micro-organismes pathogènes sera ingéré par un nombre de consommateurs beaucoup plus important qu'en restauration traditionnelle.

C'est pourquoi l'hygiène des denrées alimentaires a fait l'objet très tôt d'une réglementation européenne. Les premiers textes d'envergure furent les directives CEE 92-5 et CEE 93-43 qui font appel à la responsabilisation active des professionnels dans la maîtrise des conditions d'hygiène inhérentes aux activités de production, de transformation, de conditionnement et de distribution réalisées par les entreprises. L'expérience a montré qu'elle a permis d'assurer des bases communes pour la production hygiénique des aliments et leur sécurité.

De nouvelles conceptions, plus transversales, se sont développées et ont abouti le 12 janvier 2000 à l'adoption d'un livre blanc dont les préconisations étaient de quatre ordres :

- 1- améliorer l'expertise scientifique communautaire par la création d'une Autorité européenne de sécurité des aliments reposant sur les principes « d'indépendance, d'excellence et de transparence » ;
- 2- réorganiser la législation de chaque filière dans une approche du type « de l'étable à la table », visant à donner plus de cohérence au dispositif ;
- 3- améliorer le contrôle de la mise en œuvre de la législation en instaurant un socle commun pour les services nationaux d'inspection ;
- 4- responsabiliser l'ensemble des opérateurs, y compris les producteurs primaires, en affirmant leur responsabilité première en matière de sécurité des produits.

Le travail communautaire conduit après 2000 sur ces bases a débouché sur l'élaboration et l'adoption d'un ensemble de textes qui sont regroupés sous le nom de « pack hygiène » et qui constituent la référence actuelle en matière d'hygiène et de sécurité alimentaires.

Le pack hygiène

- Règlement CE N° 178/2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire
- Règlement CE N° 852/2004 relatif à l'hygiène générale des denrées alimentaires, y compris la production primaire
- Règlement CE N° 853/2004 relatif aux denrées d'origine animale, il complète le précédent pour certaines filières sensibles ;
- Règlement CE 183/2005 établissant les exigences en matière d'alimentation animale
- Règlement CE N° 882/2004 relatif aux contrôles officiels
- Règlement CE N° 573/2005 relatif aux critères microbiologiques

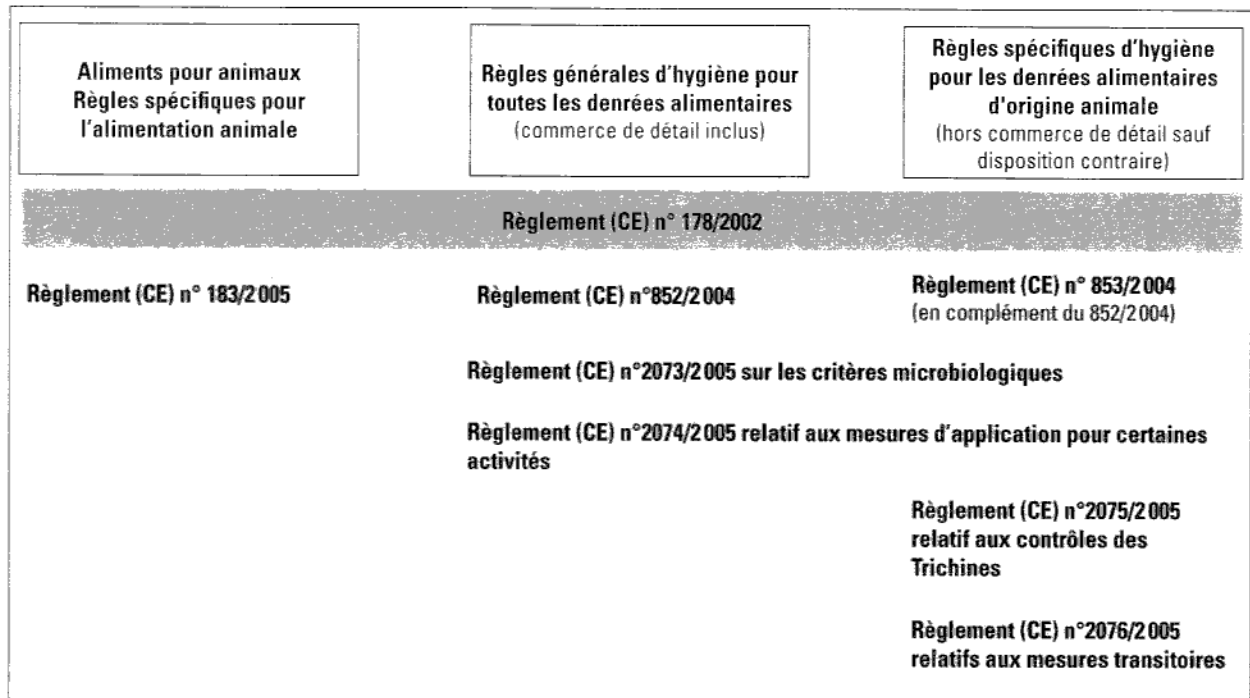


Fig. 1 – Schéma de la réglementation applicable aux professionnels

D'autre part, depuis 2002, l'Autorité européenne de sécurité des aliments donne à la Commission européenne des conseils scientifiques indépendants sur toutes les questions ayant un impact direct ou indirect sur la sécurité alimentaire. C'est une entité juridique distincte, indépendante des autres institutions européennes.

Le règlement CE 178/2002

Publié au JO du 28 janvier, il institue l'Autorité européenne de sécurité des aliments et définit la responsabilité juridique de chacun en matière de veille. Article 17 : « Les exploitants du secteur alimentaire et du secteur de l'alimentation animale, veillent, à toutes les étapes de la production, de la transformation et de la distribution dans les entreprises placées sous leur contrôle, à ce que les denrées alimentaires ou les aliments pour animaux répondent aux prescriptions de la législation alimentaire applicables à leurs activités et vérifient le respect de ces prescriptions » L'élaboration d'un système de traçabilité implique la mise en place d'un système d'identification du produit et d'enregistrement des informations.

Le règlement CE n°852/2004

Il vise à assurer l'hygiène des denrées alimentaires à toutes les étapes du processus de production, depuis la production primaire jusqu'à la vente au consommateur final. Il s'applique aux entreprises du secteur alimentaire et non aux denrées alimentaires produites à des fins privées.

Les principes essentiels sont exposés dans l'article 1^{er} :

- 1- La responsabilité première en matière de sécurité alimentaire incombe à l'exploitant. Tous les exploitants du secteur alimentaire veillent à ce que toutes les étapes dont ils sont responsables, depuis la production primaire jusqu'à la vente ou la mise à disposition des denrées alimentaires au consommateur final, soient effectuées de manière hygiénique, conformément aux dispositions du présent règlement.
- 2- La sécurité alimentaire doit être garantie à toutes les étapes de la chaîne alimentaire depuis la production primaire.
- 3- La chaîne du froid doit être maintenue, y compris pour les denrées qui ne peuvent pas être entreposées à la température ambiante, en particulier les produits congelés.
- 4- L'association généralisée de procédures fondées sur les principes HACCP, associés à la mise en œuvre de bonnes pratiques d'hygiène, devrait renforcer la responsabilité des exploitants du secteur alimentaire.

5- Les guides de bonnes pratiques constituent des outils précieux qui aident les exploitants du secteur alimentaire à respecter les règles d'hygiène alimentaire et à appliquer les principes HACCP.

Les principes de l'HACCP

Ils sont rappelés à l'article 5 :

- a. identifier tout danger qu'il y a lieu de prévenir, d'éliminer ou de ramener à un niveau convenable;
- b. identifier les points critiques aux niveaux desquels un contrôle est indispensable pour prévenir ou éliminer un danger ou pour le ramener à un niveau acceptable;
- c. établir aux points critiques de contrôle, les limites critiques qui différencient l'acceptabilité de l'inacceptabilité pour la prévention, l'élimination ou la réduction des dangers identifiés;
- d. établir les actions correctives à mettre en œuvre lorsque la surveillance révèle qu'un point critique de contrôle n'est pas maîtrisé;
- e. établir des procédures exécutées périodiquement pour vérifier l'efficacité des mesures visées aux points a) et c)
- f. établir des documents et des dossiers en fonction de la nature et la taille de l'entreprise pour prouver l'application effective de ces mesures.

Les États membres encouragent l'élaboration de guides nationaux de bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes HACCP (article 7) en se référant au *Codex alimentarius*, sous l'égide des organismes nationaux de normalisation (article 8), ainsi que de guides communautaires (article 9).

6- Agrément traçabilité

Les exploitants du secteur alimentaire qui exercent des activités autres que celles de production primaire doivent se conformer aux dispositions générales d'hygiène de l'annexe II.

Cette annexe détaille les dispositions concernant :

- les locaux, y compris les sites extérieurs;
- les conditions de transport;
- les équipements;
- les déchets alimentaires;
- l'alimentation en eau;
- l'hygiène personnelle des personnes en contact avec les denrées alimentaires;
- les denrées alimentaires elles-mêmes;
- le conditionnement et l'emballage;
- le traitement thermique, qui permet de transformer certaines denrées alimentaires;
- la formation des professionnels du secteur.

Les États membres peuvent adapter les exigences fixées à l'annexe II afin de tenir compte des besoins des exploitations du secteur alimentaire situées dans des régions soumises à des contraintes géographiques particulières ou connaissant des difficultés d'approvisionnement, qui desservent le marché local, ou afin de prendre en considération les méthodes de production traditionnelles et la taille des exploitations. Les objectifs de sûreté alimentaire ne doivent cependant pas être compromis.

L'arrêté du 23 octobre 1997 fixant les conditions d'hygiène dans les établissements de restauration collective à caractère social reste en vigueur. Ses dispositions sont, en effet, conformes à la nouvelle réglementation européenne.

On trouvera pages suivantes des extraits de l'annexe II du règlement CE N° 852/2004

ANNEXE II

**DISPOSITIONS GÉNÉRALES D'HYGIÈNE POUR TOUS LES EXPLOITANTS
DU SECTEUR ALIMENTAIRE (SAUF LORSQUE L'ANNEXE I EST APPLICABLE)**

INTRODUCTION

Les chapitres V à XII s'appliquent à toutes les étapes de la production, de la transformation et de la distribution des denrées alimentaires et les autres chapitres s'appliquent comme suit:

- le chapitre I s'applique à tous les locaux utilisés pour les denrées alimentaires, à l'exception des sites et locaux auxquels s'applique le chapitre III,
- le chapitre II s'applique à tous les locaux où les denrées alimentaires sont préparées, traitées ou transformées, à l'exception des salles à manger et des sites et locaux auxquels s'applique le chapitre III,
- le chapitre III s'applique à tous les sites et locaux énumérés dans l'intitulé du chapitre,
- le chapitre IV s'applique à tous les moyens de transport.

CHAPITRE I

Dispositions générales applicables aux locaux utilisés pour les denrées alimentaires (autres que ceux qui sont énumérés au chapitre III)

1. Les locaux par lesquels circulent les denrées alimentaires doivent être propres et en bon état d'entretien.
2. Par leur agencement, leur conception, leur construction, leur emplacement et leurs dimensions, les locaux utilisés pour les denrées alimentaires doivent:
 - a) pouvoir être convenablement entretenus, nettoyés et/ou désinfectés, prévenir ou réduire au minimum la contamination aéroportée et offrir un espace de travail suffisant pour l'exécution hygiénique de toutes les opérations;
 - b) permettre de prévenir l'encrassement, le contact avec des matériaux toxiques, le déversement de particules dans les denrées alimentaires et la formation de condensation et de moisissure indésirable sur les surfaces;
 - c) permettre la mise en œuvre de bonnes pratiques d'hygiène, notamment prévenir la contamination et en particulier lutter contre les organismes nuisibles,et
 - d) si cela est nécessaire, offrir des conditions de manutention et d'entreposage adéquates, et notamment une régulation de la température et une capacité suffisante pour maintenir les denrées alimentaires à des températures appropriées qui puissent être vérifiées et si nécessaire enregistrées.
3. Des toilettes en nombre suffisant, équipées d'une chasse d'eau et raccordées à un système d'évacuation efficace doivent être disponibles. Les toilettes ne doivent pas donner directement sur des locaux utilisés pour la manipulation des denrées alimentaires.
4. Un nombre suffisant de lavabos judicieusement situés et destinés au lavage des mains doit être disponible. Les lavabos destinés au lavage des mains doivent être équipés d'eau courante, chaude et froide, ainsi que de matériel pour le nettoyage et pour le séchage hygiénique des mains. En cas de besoin, les dispositifs de lavage des denrées alimentaires doivent être séparés de ceux destinés au lavage des mains.
5. Il doit y avoir une ventilation adéquate et suffisante, qu'elle soit naturelle ou mécanique. Il importe d'éviter tout flux d'air pulsé d'une zone contaminée vers une zone propre. Les systèmes de ventilation doivent être conçus de manière à permettre d'accéder aisément aux filtres et aux autres pièces devant être nettoyées ou remplacées.
6. Les installations sanitaires doivent disposer d'une ventilation adéquate, naturelle ou mécanique.

7. Les locaux utilisés pour les denrées alimentaires doivent avoir un éclairage naturel et/ou artificiel suffisant.
8. Les systèmes d'évacuation des eaux résiduaires doivent être suffisants pour faire face aux exigences. Ils doivent être conçus et construits de manière à éviter tout risque de contamination. Lorsqu'elles sont en partie ou totalement découvertes, les conduites d'évacuation doivent être conçues de manière à garantir que les eaux résiduaires ne coulent pas d'une zone contaminée vers une zone propre, notamment une zone où sont manipulées des denrées alimentaires susceptibles de présenter un risque élevé pour la santé des consommateurs finals.
9. Lorsque l'hygiène l'exige, des vestiaires adéquats doivent être prévus en suffisance pour le personnel.
10. Les produits de nettoyage et de désinfection ne doivent pas être entreposés dans des zones où les denrées alimentaires sont manipulées.

CHAPITRE II

Dispositions spécifiques pour les locaux où les denrées alimentaires sont préparées, traitées ou transformées (à l'exclusion des salles à manger et des sites et locaux visés au chapitre III)

1. La conception et l'agencement des locaux où les denrées alimentaires sont préparées, traitées ou transformées (à l'exclusion des salles à manger et des sites et locaux mentionnés dans l'intitulé du chapitre III, mais y compris les locaux faisant partie de moyens de transport) doivent permettre la mise en œuvre de bonnes pratiques d'hygiène et notamment prévenir la contamination entre et durant les opérations. En particulier:
 - a) les revêtements de sol doivent être bien entretenus, faciles à nettoyer et, au besoin, à désinfecter. À cet effet, l'utilisation de matériaux étanches, non absorbants, lavables et non toxiques est requise, sauf si les exploitants du secteur alimentaire peuvent prouver à l'autorité compétente que d'autres matériaux utilisés conviennent. Le cas échéant, les sols doivent permettre une évacuation adéquate en surface;
 - b) les surfaces murales doivent être bien entretenues, faciles à laver et, au besoin, à désinfecter. À cet effet, l'utilisation de matériaux étanches, non absorbants, lavables et non toxiques est requise, ainsi que d'une surface lisse jusqu'à une hauteur convenable pour les opérations, sauf si les exploitants du secteur alimentaire peuvent prouver à l'autorité compétente que d'autres matériaux utilisés conviennent;
 - c) les plafonds, faux plafonds (ou, en l'absence de plafonds, la surface intérieure du toit) et autres équipements suspendus doivent être construits et ouverts de manière à empêcher l'encrassement et à réduire la condensation, l'apparition de moisissure indésirable et le déversement de particules;
 - d) les fenêtres et autres ouvertures doivent être conçues de manière à prévenir l'encrassement. Celles qui peuvent donner accès sur l'environnement extérieur doivent, en cas de besoin, être équipées d'écrans de protection contre les insectes facilement amovibles pour le nettoyage. Lorsque l'ouverture des fenêtres entraînerait une contamination, les fenêtres doivent rester fermées et verrouillées pendant la production;
 - e) les portes doivent être faciles à nettoyer et, en cas de besoin, à désinfecter. À cet effet, l'utilisation de surfaces lisses et non absorbantes est requise, sauf si les exploitants du secteur alimentaire peuvent prouver à l'autorité compétente que d'autres matériaux utilisés conviennent,

et

 - f) les surfaces (y compris les surfaces des équipements) dans les zones où les denrées alimentaires sont manipulées, et particulièrement celles en contact avec les denrées alimentaires, doivent être bien entretenues, faciles à nettoyer et, au besoin, à désinfecter. À cet effet, l'utilisation de matériaux lisses, lavables, résistant à la corrosion et non toxiques est requise, sauf si les exploitants du secteur alimentaire peuvent prouver à l'autorité compétente que d'autres matériaux utilisés conviennent.
2. Là où cela est nécessaire, des dispositifs adéquats pour le nettoyage, la désinfection et l'entreposage des outils et équipements de travail doivent être prévus. Ces dispositifs doivent être fabriqués dans des matériaux résistants à la corrosion, être faciles à nettoyer et disposer d'une alimentation adéquate en eau chaude et froide.

3. Là où cela est nécessaire, des dispositions adéquates pour le lavage des denrées alimentaires doivent être prévues. Tout évier ou dispositif similaire de lavage des aliments doit disposer d'une alimentation adéquate en eau potable, chaude et/ou froide, être conforme aux exigences du chapitre VII et être nettoyé régulièrement et, au besoin, désinfecté.

CHAPITRE III

Dispositions applicables aux sites mobiles et/ou provisoires (tels que tentes-marquises, étals, points de vente automobiles), aux locaux utilisés principalement comme maison d'habitation, mais où des denrées alimentaires sont régulièrement préparées en vue de la mise sur le marché, ainsi qu'aux distributeurs automatiques

1. Les sites et les distributeurs automatiques doivent, autant que faire se peut, être installés, conçus, construits, nettoyés et entretenus de manière à éviter la contamination, en particulier par des animaux et parasites.
2. Plus particulièrement, là où cela est nécessaire:
 - a) des installations appropriées seront prévues pour assurer un niveau d'hygiène personnelle adéquat (elles comprendront, entre autres, des installations permettant de se laver et de se sécher les mains dans de bonnes conditions d'hygiène, des installations sanitaires hygiéniques et des vestiaires);
 - b) les surfaces en contact avec les denrées alimentaires doivent être bien entretenues, faciles à nettoyer et, au besoin, à désinfecter. À cet effet, l'utilisation de matériaux lisses, lavables, résistant à la corrosion et non toxiques est requise, sauf si les exploitants du secteur alimentaire peuvent prouver à l'autorité compétente que d'autres matériaux utilisés conviennent;
 - c) des moyens adéquats doivent être prévus pour le nettoyage et, au besoin, la désinfection des outils et équipements de travail;
 - d) lorsque les denrées alimentaires sont nettoyées dans le cadre des activités de l'entreprise, des dispositions sont prises pour que cette opération se déroule dans des conditions hygiéniques;
 - e) de l'eau potable, chaude et/ou froide, doit être prévue en quantité suffisante;
 - f) des dispositions et/ou installations adéquates doivent être prévues pour entreposer et éliminer, dans de bonnes conditions d'hygiène, les substances et déchets dangereux et/ou non comestibles, qu'ils soient solides ou liquides;
 - g) des installations et/ou dispositifs adéquats doivent être prévus pour maintenir les denrées alimentaires dans des conditions de température adéquates et pour contrôler ces dernières;
 - h) les denrées alimentaires doivent être placées à des endroits et dans des conditions permettant d'éviter, autant que faire se peut, les risques de contamination.

CHAPITRE IV

Transport

1. Les réceptacles de véhicules et/ou conteneurs servant au transport des denrées alimentaires doivent être propres et en bon état d'entretien de manière à protéger les denrées alimentaires contre toute contamination et doivent, en cas de besoin, être conçus et construits de manière à pouvoir être convenablement nettoyés et/ou désinfectés.
2. Ces réceptacles de véhicules et/ou de conteneurs doivent être réservés au transport de denrées alimentaires si celles-ci sont susceptibles d'être contaminées par des chargements d'autre nature.
3. Lorsque des réceptacles de véhicules et/ou conteneurs sont utilisés pour transporter d'autres produits en plus des denrées alimentaires ou pour transporter différentes denrées alimentaires en même temps, les produits doivent, au besoin, être séparés efficacement.

4. Les denrées alimentaires en vrac à l'état liquide, granulaire ou poudreux doivent être transportées dans des réceptacles et/ou conteneurs/citernes réservés au transport de denrées alimentaires. Sur les conteneurs doit figurer une mention clairement visible et indélébile, dans une ou plusieurs langues de la Communauté, relative à leur utilisation pour le transport de denrées alimentaires, ou la mention «Uniquement pour denrées alimentaires».
5. Lorsque des réceptacles de véhicules et/ou conteneurs ont été utilisés pour transporter des produits autres que des denrées alimentaires ou pour transporter des denrées alimentaires différentes, un nettoyage efficace doit être effectué entre deux chargements pour éviter le risque de contamination.
6. Les denrées alimentaires chargées dans des réceptacles de véhicules et/ou conteneurs doivent être placées et protégées de manière à réduire au maximum le risque de contamination.
7. Si cela est nécessaire, les réceptacles de véhicules et/ou conteneurs servant au transport de denrées alimentaires doivent être aptes à maintenir les denrées alimentaires à des températures appropriées et permettre le contrôle desdites températures.

CHAPITRE V

Dispositions applicables aux équipements

1. Tous les articles, installations et équipements avec lesquels les denrées alimentaires entrent en contact doivent:
 - a) être effectivement nettoyés et, le cas échéant, désinfectés. Le nettoyage et la désinfection doivent avoir lieu à une fréquence suffisante pour éviter tout risque de contamination;
 - b) être construits, réalisés et entretenus de manière à réduire au maximum les risques de contamination;
 - c) à l'exception des conteneurs et emballages perdus, être construits, réalisés et entretenus de manière à ce qu'ils soient tenus propres et, au besoin, désinfectés,et
 - d) être installés de manière à permettre un nettoyage convenable des équipements et de la zone environnante.
2. Si cela est nécessaire, les équipements doivent être munis d'un dispositif de contrôle approprié pour garantir la réalisation des objectifs du présent règlement.
3. S'il est nécessaire pour empêcher la corrosion des équipements et des récipients d'utiliser des additifs chimiques, ils doivent l'être conformément aux bonnes pratiques.

CHAPITRE VI

Déchets alimentaires

1. Les déchets alimentaires, sous-produits non comestibles et autres déchets doivent être retirés aussi vite que possible des locaux où se trouvent des denrées alimentaires, de façon à éviter qu'ils ne s'accumulent.
2. Les déchets alimentaires, sous-produits non comestibles et autres déchets doivent être déposés dans des conteneurs dotés d'une fermeture, sauf si les exploitants du secteur alimentaire peuvent prouver à l'autorité compétente que d'autres types de conteneurs ou de systèmes d'évacuation utilisés conviennent. Ceux-ci doivent être conçus de manière adéquate, être bien entretenus et faciles à nettoyer et, au besoin, à désinfecter.
3. Des dispositions adéquates doivent être prévues pour l'entreposage et l'élimination des déchets alimentaires, des sous-produits non comestibles et des autres déchets. Les aires de stockage des déchets doivent être conçues et gérées de manière à pouvoir être propres en permanence et, le cas échéant, exemptes d'animaux et de parasites.
4. Tous les déchets doivent être éliminés de façon hygiénique et dans le respect de l'environnement, conformément à la législation communautaire applicable à cet effet, et ne doivent pas constituer une source de contamination directe ou indirecte.

Appliqués à la restauration collective, ces textes suggèrent une démarche à trois niveaux :

- **Éviter ou limiter les apports microbiens**

Cela suppose :

1. d'utiliser des produits sains ;
2. de disposer de locaux et d'un équipement adaptés et en parfait état d'entretien ;
3. d'assurer la séparation des secteurs propres et secteurs souillés ;
4. de nettoyer et désinfecter soigneusement les outils de travail ;
5. de respecter les règles d'hygiène du personnel ;

donc de respecter les règles d'hygiène des locaux, du matériel et du personnel, en amont des préparations (l'hygiène des différentes denrées utilisées dans la préparation des plats cuisinés : viandes, volailles, produits de la mer, lait, ovoproduits... est réglementée), pendant et après le travail en cuisine.

- **Limiter la multiplication des micro-organismes**

Cet objectif peut être atteint en limitant le plus possible, au cours du refroidissement ou du réchauffement des aliments, leur temps de contact à une température comprise entre +10 °C et +65 °C. Ces températures sont, en effet, très favorables au développement microbien.

Concrètement, il s'agit de :

1. respecter la chaîne du chaud ;
2. respecter la chaîne du froid ;
3. ne pas conserver le produit trop longtemps (les durées de conservation sont fonction du type de liaison choisie).

- **Détruire les germes, les toxines et les spores**

en pratiquant une cuisson assainissante.

CHAPITRE VIII

ÉVITER LES APPORTS MICROBIENS

1. En amont des préparations : produire des matières premières peu contaminées

Toutes les denrées « de base » sont concernées par les dispositions du « pack hygiène », en particulier par les règlements CE n° 852/2004 et CE 853/2004, qui englobent l'ensemble de la filière alimentaire, y compris la production primaire. Ces textes remplacent la directive 93/43.

Ils introduisent de nouvelles règles : responsabilité première des opérateurs, traçabilité, qui sont en vigueur depuis le 1er janvier 2005. Les nouvelles dispositions concernant l'hygiène des aliments sont effectives depuis le 1er janvier 2006. Elles consacrent et renforcent l'approche, alors nouvelle, de 1993. La réglementation fournit des objectifs à atteindre par les professionnels, en leur laissant des choix sur les moyens d'y parvenir. La mise en place de procédures basées sur le principe de l'HACCP est généralisée (la production primaire mise à part) et le recours aux guides de bonnes pratiques d'hygiène fortement encouragé. Ces guides sont rédigés par les professionnels et sont validés par l'administration ; ils sont, le plus souvent nationaux, des guides européens de bonnes pratiques d'hygiène existent, d'autres seront élaborés.

L'annexe II du règlement CE n° 852/2004 précise les dispositions concernant l'hygiène des locaux, celle des équipements, le transport des denrées et l'hygiène personnelle (voir document 1 chapitre VII).

1.1. Règles d'hygiène concernant les produits de la mer

Les conditions d'hygiène relatives à la pêche, à la préparation, la transformation, le transport et la vente des produits de la mer sont règlementées par le règlement CE n° 853/2004 du 29 avril 2004, annexe III

Le terme « produits de la mer » recouvre classiquement :

- les animaux vivants (crustacés, mollusques) ;
- les produits frais qui ne sont pas présentés à l'état vivant et n'ont subi aucun traitement de nature à assurer leur conservation, à l'exception de l'action du froid au-dessus de leur point de congélation ;
- les semi-conserves obtenues par salage, séchage, fumage ou cuisson et conditionnées dans un récipient étanche aux liquides ;
- les conserves pasteurisées qui ont subi, dans leur emballage étanche, un traitement thermique suffisant pour détruire les formes végétatives des micro-organismes pathogènes.

1.1.1. Le circuit des produits de la pêche (fig. 1)

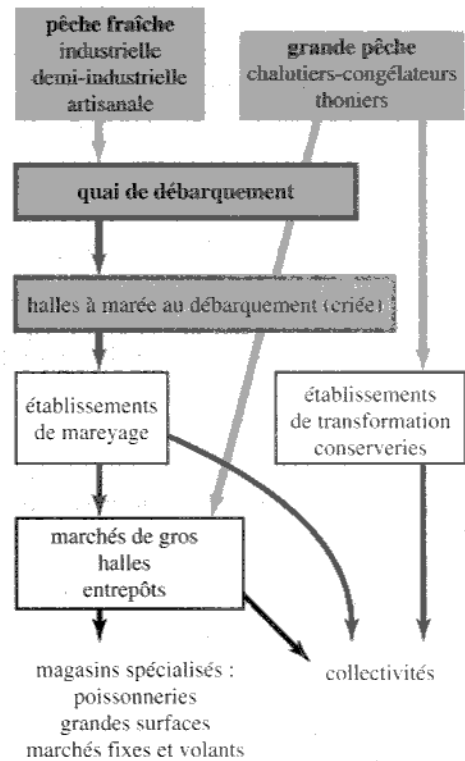


Fig. 1 – Le circuit des produits de la pêche

1.1.2. Réglementation relative aux poissons et crustacés

1.1.2.1. Mesures d'hygiène applicables sur les lieux de pêche

Le problème est différent selon la taille du navire.

D'une façon générale, les trois mesures conditionnant la bonne conservation du poisson frais sont l'éviscération, le lavage et la mise sous glace (ou la congélation).

- **L'éviscération**

Elle a pour but d'éliminer la principale cause d'altération du poisson : les micro-organismes intestinaux.

- **Le lavage**

Il élimine une proportion importante des germes peuplant les téguments et ceux restant au niveau ventral après l'éviscération.

- **La conservation au froid**

La conservation au froid (sous glace pour le poisson frais) empêche la prolifération des micro-organismes ayant échappé aux traitements précédents. La zone de température choisie va de 0 °C à +2 °C. Ces conditions sont encore plus strictes que pour les viandes hachées ou les plats cuisinés à l'avance, considérés comme très vulnérables. Ceci s'explique par le fait que les flores commensales des poissons sont surtout constituées de germes psychrotrophes et psychrophiles.

Ces opérations sont, en général, effectuées sur des navires de pêche de dimensions importantes restant plusieurs jours en mer.

Par contre, les embarcations armées pour la petite pêche côtière sont rarement équipées d'installations frigorifiques car le délai séparant les prises et leur arrivée au port est relativement court. Le poisson est alors traité par des établissements qui le préparent et le transforment : établissements de mareyage ou conserveries.

Une règle d'hygiène à bord des navires de pêche est de stocker le produit de la pêche dans un local particulier et dans des récipients ou dans des conditions telles que le poisson n'ait aucun contact avec le sol.

1.1.2.2. Mesures concernant l'ensemble de la chaîne

Certaines dispositions réglementaires s'appliquent tout au long de la chaîne qui achemine le poisson du navire jusque chez le détaillant.

- **Mesures concernant la chaîne du froid**

- **Dans les navires de pêche (sauf petite pêche côtière)**

Les produits sont soumis à l'action du froid le plus rapidement possible après leur capture, à l'exception des produits destinés à être commercialisés vivants qui doivent néanmoins être tenus à l'abri de la chaleur.

La quantité de glace utilisée à bord pour la réfrigération des produits frais est suffisante pour que la température interne des produits au débarquement soit comprise entre 0 °C et + 2 °C. L'eau de fusion de la glace doit pouvoir s'écouler librement. En aucun cas, les produits de la pêche ne doivent séjourner dans cette eau ou sur le plancher de la cale.

La glace utilisée pour la réfrigération des produits est fabriquée avec de l'eau potable. Toutefois, l'eau de mer peut être utilisée, à condition que la glace obtenue ne puisse nuire à la qualité et à la salubrité des produits. La glace est répartie de façon à permettre et à maintenir une réfrigération efficace et homogène des produits réfrigérés.

Si les poissons sont congelés à bord, la température centrale de ces produits doit être, en fin de congélation, inférieure ou égale à - 18 °C et maintenue à cette température dans les locaux d'entreposage.

- **Dans les établissements de préparation et de transformation**

Le poisson frais doit être, en vue de son expédition, placé sous glace. Toutes les précautions décrites précédemment sont applicables. Des reglaçages doivent être effectués aussi souvent que nécessaire.

Lorsque les produits frais ne sont pas expédiés le jour même du débarquement, ils sont entreposés sous glace dans une chambre froide. La température à cœur du poisson doit être maintenu entre 0 °C et +2 °C. Dans le cas de la réception de poisson congelé, celui-ci est entreposé dans des locaux où la température ambiante est au plus égale à - 18 °C.

- **Dans les lieux de vente en gros et demi-gros**

Pendant les opérations de vente, les poissons frais sont réfrigérés avec de la glace. Les conditions de réfrigération sont les mêmes qu'exposées précédemment.

À l'issue de la vente journalière, les poissons frais invendus sont, le cas échéant, reglacés en vue de réaliser les conditions déjà décrites. La glace complémentaire utilisée pour cette opération ne doit pas avoir été employée pour un glaçage antérieur. En outre, ces produits sont entreposés dans une chambre froide à l'intérieur de laquelle la température est comprise entre 0 °C et +2 °C. Pendant les opérations de vente, les poissons présentés à l'état frais sont maintenus à cette température.

Les produits congelés, destinés à être vendus en l'état, exposés à la vente ou entreposés, sont maintenus à une température égale ou inférieure à - 18 °C.

Les produits de la pêche destinés à la consommation humaine ainsi que les navires de pêche et navires usines sont soumis à contrôle sanitaire et surveillance de la part des professionnels et des services d'inspection.

– Dans les établissements de vente au détail

Nature du produit	Température interne des produits	Conditions de vente
Poissons frais et céphalopodes non préemballés		
Pendant l'exposition.	0 °C à +5 °C, tolérance de 0 °C à +10 °C pour les animaux de grande taille	Réfrigération avec une quantité de glace suffisante, même si l'étal est réfrigéré.
Hors exposition.	0 °C à +2 °C	Entreposage sous glace.
Autres produits de la pêche		
Poissons frais, entiers, préemballés, Filets, tranches, parties de poissons frais, préemballés ou non. Produits cuits et décoquillés. Produits décongelés.	0 °C à +5 °C de façon permanente	Réfrigération au moyen de : – vitrine réfrigérée ; – glace fondante avec laquelle il ne doit pas y avoir de contact direct. Les produits décongelés ne doivent pas être recongelés.
Produits congelés.	inférieure à – 18 °C	
Produits fumés.	inférieure à +15 °C	

Tableau 1 – Les règles d'hygiène applicables aux établissements de vente au détail

- Mesures concernant la propreté des eaux de lavage

À chaque étape de la chaîne, un lavage du poisson peut être bénéfique. On élimine ainsi une proportion importante des micro-organismes psychrotrophes qui auraient pu se développer. La réglementation insiste sur la qualité de l'eau qui ne doit en aucun cas être à l'origine de contamination.

- Mesures concernant l'évacuation des déchets

À défaut d'un dispositif particulier mis en place en vue de l'évacuation des déchets, ceux-ci, dans tous les établissements, sont placés dans des récipients étanches, faciles à nettoyer et à désinfecter, munis d'un couvercle à fermeture jointive et entourés extérieurement d'une bande horizontale de peinture jaune de 5 cm de largeur au moins. Sitôt après leur remplissage, ces récipients sont fermés. Les récipients contenant les déchets sont évacués, au minimum à l'issue de chaque journée de travail, sur un emplacement ou local prévu à cet effet. Les récipients sont soigneusement nettoyés et désinfectés après leur utilisation.

- Mesures particulières concernant les filets de poissons

Les poissons frais sont triés et lavés immédiatement après le filetage. Des précautions particulières sont prises pour éviter la contamination ou la souillure des filets. Les opérations de lavage, d'éviscération et de filetage sont effectuées sur des emplacements différents. Les filets préparés ne doivent pas présenter de caillots de sang, de fragments de viscères ou autres débris organiques. Ils ne doivent pas séjourner sur la table de travail au-delà du temps nécessaire pour leur préparation. Enfin, les filets sont isolés des parois du récipient d'emballage et de la glace au moyen d'une enveloppe protectrice. Ils sont entreposés à une température comprise entre 0 °C et +2 °C.

1.1.3. Hygiène des coquillages

Sous cette dénomination, sont regroupées les espèces marines appartenant aux groupes des mollusques bivalves (huîtres, moules, palourdes, coques, praires...), des gastéropodes, des échinodermes (oursins) et des tuniciers.

Parmi ces espèces, les mollusques bivalves sont capable de concentrer des composés toxiques ou nocifs, d'origine naturelle ou rejetés dans l'environnement, susceptibles d'avoir un effet négatif sur la santé. Il en est de même pour la pollution bactérienne ou virale (*Salmonella*, virus de l'hépatite A et de la poliomyélite). Le pouvoir de concentration de certains bivalves amplifie les effets néfastes de la pollution : une huître, par exemple, filtre 5 litres d'eau en 24 heures.

1.1.3.1. Mollusques bivalves

- Classement des zones de production

Le règlement européen n° 854/2004 établit trois types de zones de production, en fonction du niveau de contamination fécale

– Les zones A

Les mollusques bivalves vivants provenant de ces zones « doivent satisfaire aux normes sanitaires définies par le règlement CE n° 853/2004. Ces coquillages peuvent être récoltés pour la consommation humaine directe ».

– Les zones B

L'autorité compétente peut y classer les zones dans lesquelles les mollusques ne contiennent pas plus de 4600 *E.coli* pour 100 g de chair et de liquide intravalvaire (méthode du nombre le plus probable, 5 tubes, 3 dilutions). Les mollusques bivalves vivants peuvent y être récoltés mais ne peuvent être mis sur le marché pour la consommation humaine qu'après avoir subi un traitement dans un centre de purification ou après reparcage en vue de satisfaire aux normes sanitaires, c'est-à-dire aux conditions de la zone A.

– Les zones C

Elles correspondent aux zones dans lesquelles les mollusques ne contiennent pas plus de 46000 *E.coli* pour 100 grammes de chair et de liquide intravalvaire. Ces derniers peuvent être récoltés mais ne peuvent être mis sur le marché qu'après un reparcage de longue durée, lorsqu'ils satisfont aux normes sanitaires.

• Contrôle des zones de production et de reparcage

Les zones de production et de reparcage sont contrôlées à intervalle régulier afin de vérifier :

- la qualité microbiologique des mollusques bivalves en fonction des zones de production ou de reparcage ;
- l'absence de plancton toxigène dans les eaux de production, de reparcage et de biotoxines dans les bivalves vivants ;
- l'absence de contaminants chimiques.

La recherche des toxines est, en principe, hebdomadaire, elle peut être espacée si l'analyse des risques le permet.

• Transport

Le transport des coquillages à destination d'une autre zone de production, d'un centre de reparcage, d'un centre de purification ou d'un établissement de vente doit être réalisé dans des conditions préservant la vitalité des coquillages et leur qualité hygiénique.

• Centres d'expédition

Seuls peuvent être mis sur le marché pour la consommation humaine les coquillages répondant aux critères d'hygiène fixés par la réglementation et provenant de centres d'expédition agréés. Les expéditions font l'objet d'un marquage sanitaire. Le responsable du centre d'expédition a pour obligation de soumettre à analyse des prélèvements représentatifs des différentes espèces destinées à l'expédition, de tenir et conserver, archivés dans l'ordre chronologique, pendant au moins six mois, les résultats des analyses, les entrées et expéditions des coquillages.

1.1.3.2. Mollusques cuits

Les critères microbiologiques de ces produits sont fixés par le règlement CE n°573/2005.

Le respect de ces critères implique des contrôles réguliers de la part des entreprises. Les programmes d'échantillonnage sont établis par les responsables des établissements, en fonction de la nature des produits (entiers, décoquillés, décortiqués...), de la température et du temps de cuisson, ainsi que de l'analyse des risques effectuée au sein de l'établissement.

1.2. Hygiène des viandes

Les paragraphes 1.2.1, 1.2.2 et 1.2.3 concernent les ongulés et équidés : bovins, ovins, porcins en particulier.

1.2.1. Le circuit de la viande dans l'abattoir (fig. 2)

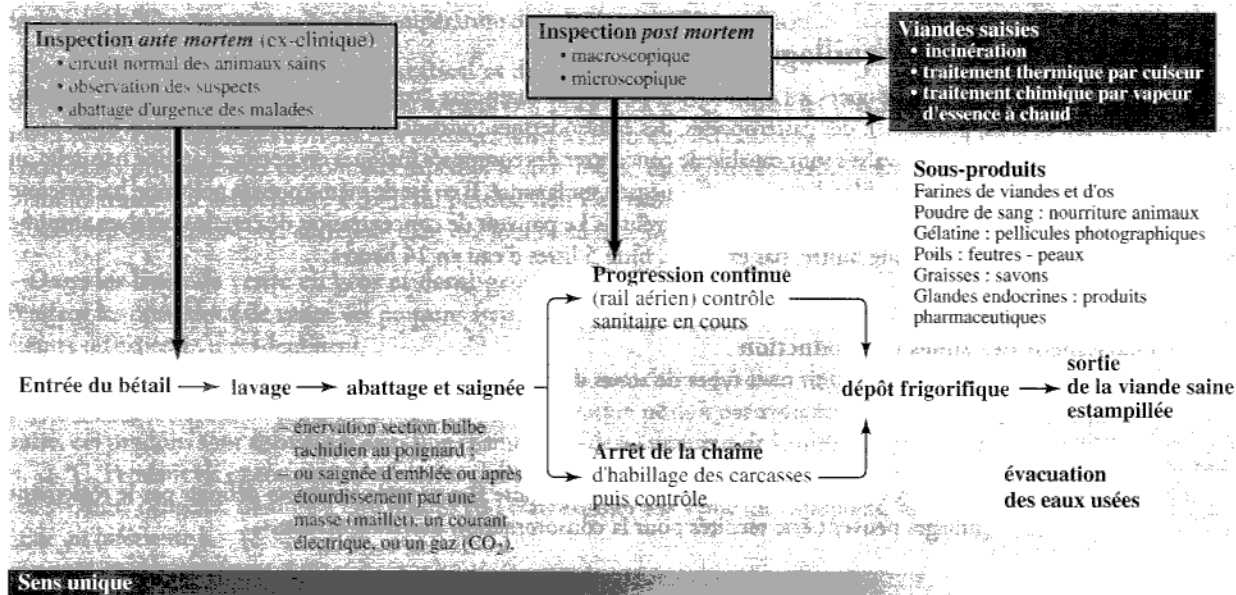


Fig. 2 – Circuit de la viande dans l'abattoir (d'après le professeur J. Zourbas)

1.2.2. Hygiène de l'abattage

Les conditions d'installation, d'équipement et d'hygiène auxquelles doivent satisfaire les abattoirs pour être agréés pour la production et la mise sur le marché de viandes fraîches, ainsi que les dispositions de l'inspection sanitaire de ces établissements sont codifiées par le règlement CE n° 853/2004 annexe III.

1.2.2.1. Conditions d'installation et d'équipement

Le "paquet hygiène", entré en vigueur le 1^{er} janvier 2006, prévoit que tous les abattoirs devront être agréés CEE. Les abattoirs qui bénéficient aujourd'hui de l'agrément loco-régional (commercialisation des viandes dans le département d'implantation de l'abattoir et dans les départements limitrophes) devront se mettre aux normes en vue de l'obtention de l'agrément CEE. Ils disposeront de 4 ans (jusqu'au 1^{er} janvier 2010) pour effectuer cette mise aux normes.

Les abattoirs où sont traités les ongulés doivent disposer :

- de locaux de stabulation appropriés et hygiéniques ou d'un parc d'attente d'une taille suffisante pour l'hébergement des animaux, ils doivent être aménagés pour faciliter l'inspection *ante mortem*;
- d'installations séparées fermant à clé pour l'hébergement des animaux malades, équipées d'un dispositif d'évacuation distinct pour éviter la contamination du bétail sain;
- d'un nombre suffisant de locaux adaptés aux opérations d'abattage;
- d'un local séparé pour la vidange et le nettoyage des estomacs et intestins.

La configuration des locaux doit également permettre d'assurer la séparation de l'étourdissement et de la saignée, de l'éviscération et de la poursuite de l'habillage. La manipulation des boyaux, la préparation et le conditionnement des abats, l'expédition des viandes, la désinfection des outils (eau chaude à 82°C) nécessitent aussi des locaux séparés et spécialisés.

Les chaînes d'abattage sont conçues de façon à permettre le déroulement en continu de l'ensemble du processus.

1.2.2.2. Règles d'hygiène relatives au travail dans les abattoirs

• Entrée du bétail

Tout animal de boucherie ou de charcuterie introduit dans les parcs de comptage ou les locaux de stabulation doit être abattu dans les meilleurs délais.

• Inspection *ante mortem*

Les animaux sont soumis à l'inspection *ante mortem*, le jour de leur arrivée à l'abattoir ou avant le début de l'abattage journalier.

Cette inspection doit permettre de préciser :

- si des animaux sont atteints d'une maladie transmissible à l'homme et aux animaux ou s'ils présentent des symptômes permettant de craindre l'apparition d'une telle maladie;
- s'ils présentent des symptômes d'une maladie ou d'une perturbation de l'état général susceptibles de rendre les viandes impropres à la consommation humaine;
- s'ils sont fatigués ou blessés.

• Abattage, saignée et dépouillement

Les animaux sont sacrifiés et préparés dans les emplacements réservés à chaque espèce. La saignée doit être complète et suivre immédiatement l'étourdissement.

Les opérations de saignée, de dépouillement ou d'enlèvement des soies, d'habillage et d'éviscération sont conduites dans le respect des prescriptions d'hygiène et de façon à éviter toute contamination de la viande. Ainsi, les carcasses ne doivent pas entrer en contact avec le sol, les murs ou les postes de travail, elles doivent être exemptes de toute trace de contamination fécale. Au cours des opérations d'habillage, la face extérieure du cuir ne doit pas entrer en contact avec la viande. Toute incision du cuir doit être faite avec un couteau dédié. L'arrachage du cuir est effectué de préférence sur carcasse suspendue, depuis l'arrière vers l'avant. L'éviscération est la plus précoce possible, elle ne doit pas entraîner de souillures sur la carcasse, le rectum et l'œsophage doivent être correctement ensachés ou ligaturés. L'arrosage des carcasses pour éliminer les souillures fécales est interdit. Les cuirs, peaux, cornes et ongles sont transportés dans des salles réservées à cet usage.

• Inspection *post mortem*

Les opérations d'abattage et d'habillage sont placées sous la surveillance du service d'inspection. Toutes les parties de l'animal, y compris le sang, doivent être soumises à l'inspection immédiatement après l'abattage. L'inspection *post mortem* comporte : l'examen visuel de l'animal abattu, la palpation et des incisions de certains organes (poumons, foie, rate, langue, organes lymphatiques...), la recherche d'anomalies de consistance, de couleur, d'odeur, des examens de laboratoire au besoin.

En outre, l'examen *post mortem* comprend la recherche de la cysticercose sur les porcins, de la morve chez les solipèdes et des trichines sur les viandes porcine et chevaline.

• Hygiène du matériel et des locaux

Les salles de travail sont désinfectées une fois par mois et chaque fois qu'une maladie transmissible est constatée. Le matériel, les instruments et les récipients utilisés pour la préparation des carcasses et la manipulation des viandes sont maintenus en

bon état de propreté et ne doivent être utilisés qu'au travail des viandes fraîches. Ils doivent être soigneusement nettoyés et désinfectés plusieurs fois par jour, ainsi qu'à la fin de chaque journée de travail et avant d'être réutilisés après avoir été souillés. L'utilisation des désinfectants est obligatoirement suivie d'un rinçage à l'eau potable.

• Hygiène du personnel

Le travail et la manipulation de la viande sont interdits aux personnes susceptibles de les contaminer. Un certificat médical est exigé pour toute personne affectée à ce travail. Il doit être renouvelé chaque année.

Le personnel travaillant dans des locaux où des viandes fraîches sont manipulées, emballées ou transportées porte des coiffures et des chaussures propres et faciles à nettoyer, des vêtements de travail de couleur claire et, le cas échéant, des protège-nuque ou d'autres vêtements de protection. Il est tenu de se laver et de se désinfecter les mains plusieurs fois au cours d'une journée de travail, en particulier à chaque reprise de travail et à la sortie des toilettes. Les personnes ayant été en contact avec des animaux malades, ou qui ont manipulé des viandes contaminées doivent immédiatement se laver les mains et les bras avec de l'eau chaude, puis les désinfecter.

Il est interdit de fumer dans les locaux de travail.

• Estampillage

La conformité aux normes sanitaires des viandes de boucherie est attestée par l'apposition sur les denrées de marques sanitaires réglementées par l'arrêté du 15 mai 1974 et la circulaire du 3 octobre 1974.

1.2.3. Hygiène des opérations de préparation, découpe, désossage et mise sur le marché des viandes

1.2.3.1. Conditions d'installation et d'équipement

Les établissements assurant la préparation, la découpe, le désossage et la mise sur le marché des viandes doivent être de dimensions suffisantes pour permettre une progression continue des différentes opérations, sans croisement ni chevauchement des circuits, ainsi que la séparation des secteurs propres et souillés. Les ateliers doivent comporter au moins :

- un local, doté d'un thermomètre enregistreur, destiné aux opérations de désossage, de découpage et de conditionnement ;
- un local d'emballage ;
- un local, protégé des poussières, destiné à recevoir les matériaux d'emballage et de conditionnement ;
- des locaux frigorifiques distincts pour recevoir les viandes destinées à être découpées, les viandes découpées ou désossées et, le cas échéant, les viandes emballées ;
- une unité de congélation ou de surgélation ;
- un local destiné à recevoir les déchets et les viandes non destinées à la consommation humaine ;
- un local pour le nettoyage du matériel ;
- des emplacements destinés à la désinfection des moyens de transports ;
- le plus près possible des postes de travail, des dispositifs pour le nettoyage des mains et le nettoyage du matériel à l'eau chaude, avec robinets à commandes non manuelles, produits de nettoyage et de désinfection, moyens hygiéniques de séchage des mains ;
- des dispositifs pour la désinfection des outils, pourvus d'une eau à température minimale de + 82 °C et dont l'écoulement est raccordé à la canalisation des eaux usées ;
- des vestiaires et des sanitaires répondant aux caractéristiques présentées précédemment.

1.2.3.2. Hygiène du fonctionnement

Les viandes travaillées dans un atelier de découpe proviennent exclusivement d'animaux abattus dans des abattoirs agréés. Elles doivent être préparées, manipulées, transportées et stockées dans des établissements agréés.

Les viandes sont introduites dans les locaux de travail au fur et à mesure des besoins ; dans ces locaux, la température est de 12°C maximum. Sitôt l'opération terminée, elles doivent être transportées dans un local frigorifique. Le découpage doit être exécuté de façon à éviter toute souillure. Il est interdit de planter des couteaux dans les viandes et de les nettoyer avec un linge ou d'autres matériaux.

Les viandes fraîches doivent être maintenues, pendant l'ensemble des opérations de découpage, de désossage et de conditionnement, à une température interne égale ou inférieure à +7 °C (égale ou inférieure à +3 °C pour les abats). Elles sont maintenues pendant le stockage à une température égale ou inférieure à :

- +7 °C pour les viandes réfrigérées ;
- +3 °C pour les abats réfrigérés ;
- – 18 °C pour les viandes congelées.

Les règles d'hygiène des locaux et du personnel sont voisines ou identiques à celles du travail en abattoir.

1.2.3.3. Agrément

Quiconque se propose de se livrer au découpage ou au désossage des viandes doit adresser au préfet du département une déclaration. Les établissements agréés sont inscrits sur une liste publiée au *Journal officiel*. L'agrément peut être suspendu lorsque des manques d'hygiène sont constatés par l'Inspection vétérinaire.

1.2.3.4. Conditions d'hygiène dans les marchés de gros

La plupart des dispositions précédentes sont transposables aux marchés de gros. Notons que la température maximale de stockage des volailles et des lapins est de +4 °C.

1.2.4. Dispositions relatives aux viandes hachées, préparations de viandes et viandes séparées mécaniquement (VSM)

Elles relèvent du règlement CE n°853/2004, annexe III, section V.

Le morcelage est un facteur aggravant de la contamination microbienne. En effet, la destruction des cellules entraîne la libération des enzymes qu'elles contiennent et le hachage favorise l'introduction des germes présents en surface à l'intérieur de la préparation. C'est pourquoi ces viandes font l'objet d'une réglementation particulière.

1.2.4.1. Les viandes hachées et les préparations de viandes

• Pendant la production

Les viandes utilisées doivent être maintenues à une température ne dépassant pas 4°C pour les volailles, 3°C pour les abats et 7°C pour les autres viandes. Lorsqu'elles proviennent de viandes réfrigérées, les viandes hachées et les préparations de viandes doivent être préparées dans un délai maximal de six jours après l'abattage. Ce délai est réduit à trois jours pour les volailles, il est porté à quinze jours pour les viandes bovines désossées et/ou emballées sous vide.

• Après la production

Elles doivent être immédiatement conditionnées ou emballées, refroidies à une température à cœur ne dépassant pas 2°C pour les viandes hachées et 4°C pour les préparations de viandes ou congelées à une température maximale de -18°C. Ces conditions de température doivent être maintenues durant le stockage et le transport. Elles ne peuvent être congelées après décongélation.

1.2.4.2. Viandes séparées mécaniquement

Les exigences réglementaires sont les suivantes :

- lorsqu'elles proviennent d'un abattoir sur place, les matières premières à désosser ne peuvent avoir plus de sept jours pour la viande bovine. Ce délai est réduit à 5 jours dans les autres cas et à 3 jours pour la viande de volaille ;
- si elles ne sont pas utilisées dans l'heure qui suit leur obtention, les VSM sont immédiatement réfrigérées à une température maximale de +2°C. Elles doivent alors être utilisées dans les 24 heures ou être congelées ;
- elles ne peuvent être recongelées après décongélation.

1.2.5. Volailles et lagomorphes (lapins, lièvres et rongeurs domestiques)

Afin de prendre en compte l'émergence de nouveaux risques sanitaires liés aux volailles (grippe aviaire), le règlement européen 853/2004 développe les mesures d'hygiène et certaines exigences nouvelles concernant les locaux, leur utilisation et l'activité dans les ateliers de découpe de volailles. Les lapins, lièvres et autres rongeurs domestiques sont associés à ce règlement.

1.2.5.1. Locaux

• Les abattoirs

Ils doivent disposer :

- d'un local ou d'un emplacement couvert pour la réception des animaux et l'inspection *ante mortem* ;
- d'un local séparé pour l'éviscération et la poursuite de l'habillage ;
- d'un local séparé pour le nettoyage, le lavage et la désinfection des équipements de transport (caisses).

De plus, il est obligatoire d'assurer la séparation dans le temps et dans l'espace :

- de l'étourdissement et de la saignée ;
- de la plumaison ou du dépouillement ;
- de l'expédition des viandes.

Les installations doivent permettre d'éviter le contact entre les viandes et les sols, les murs et les équipements.

Lorsqu'elles existent, les chaînes d'abattage sont conçues de façon à permettre le déroulement en continu des opérations.

Les abattoirs doivent disposer d'installations pour la désinfection des outils avec de l'eau chaude à une température au moins égale à 82°C.

• Les ateliers de découpe

La conception des ateliers de découpe fait aussi l'objet d'exigences spécifiques. Ces derniers doivent permettre :

- un déroulement des opérations en continu ;
- de séparer les différents lots de production.

Ils sont dotés d'installations destinées à la désinfection des outils avec une eau à une température au moins égale à 82°C (ou un autre système équivalent), de dispositifs de lavage hygiénique des mains.

1.2.5.2. L'abattage

Il comprend obligatoirement les étapes suivantes: inspection *ante mortem*, étourdissement, saignée, dépouillement ou plumaison, éviscération, inspection *post mortem*. L'éviscération doit être effectuée le plus tôt possible après la plumaison. Après l'éviscération, les animaux sont nettoyés et réfrigérés à +4°C. Lorsque la réfrigération est réalisée par immersion, le dispositif doit être vidé, nettoyé et désinfecté au moins une fois par jour.

1.2.5.3. Pendant et après la découpe et le désossage

Pendant l'ensemble du travail de préparation qui suit l'abattage: découpe, désossage, parage, tranchage, conditionnement et emballage, la température de la viande est maintenue à +4°C maximum.

Si différentes espèces sont travaillées, les opérations seront séparées, dans l'espace et dans le temps, pour chaque espèce. Lors de l'entreposage, les viandes nues sont séparées des viandes emballées.

L'abattage des volailles et lagomorphes dans l'exploitation reste autorisé à condition que l'exploitation soit soumise à des inspections vétérinaires régulières, que l'exploitant informe l'autorité compétente de la date et de l'heure de l'abattage et qu'il dispose des locaux adaptés.

1.2.6. Produits à base de viande

Les conditions hygiéniques et sanitaires de leur production et de mise sur le marché sont fixées par l'arrêté du 22 janvier 1993.

1.2.6.1. Définition

Les produits dits à base de viande s'opposent aux viandes fraîches et aux préparations de viandes par le fait qu'ils ont subi un traitement tel que la surface de coupe à cœur de la viande (constituant la totalité ou partie du produit fabriqué) permet de constater la disparition des caractéristiques de la viande fraîche.

Les plats cuisinés comprenant de la viande sont désormais considérés comme produits à base de viande, dès lors :

- qu'ils sont préparés dans un établissement conforme à la réglementation ;
- qu'ils sont conservés par le froid et conditionnés.

1.2.6.2. Origine des matières premières

De façon générale, les établissements agréés préparant des produits à base de viande revêtus d'une marque de salubrité communautaire ne peuvent utiliser, pour la fabrication de ces produits, que des matières premières provenant elles-mêmes d'établissements agréés et titulaires de marques de salubrité adéquates.

Cependant, il est possible, pour un établissement agréé, d'utiliser des viandes fraîches provenant d'un abattoir ou d'un atelier de découpe dérogatoire temporaire (selon les dispositions de l'arrêté du 17 mars 1992), à condition de les entreposer et de les utiliser dans des emplacements séparés de ceux réservés aux produits agréés et d'assurer une traçabilité.

1.2.6.3. Autocontrôles

L'arrêté du 22 janvier 1993 rend obligatoire la mise en place par les professionnels d'un système d'autocontrôles. Ces autocontrôles comprennent *a minima* les éléments suivants :

- « l'identification des points critiques dans leur établissement » : on entend par « point critique une étape déterminante au regard de la salubrité et de l'hygiène du produit, dont la maîtrise permet de prévenir un danger, de l'éliminer ou de le réduire à un niveau acceptable » ;
- « l'établissement et la mise en œuvre des méthodes de surveillance et de contrôle de ces points critiques » : par « surveillance et contrôle », il y a lieu d'entendre l'ensemble des observations ou des mesures préétablies (par l'industriel ou le fabricant) nécessaires pour s'assurer que les points critiques sont effectivement maîtrisés ;
- « des prélèvements d'échantillons » : dans ce contexte, la notion de vérification du respect des prescriptions de cet alinéa se réfère, d'une part à l'ensemble des examens et mesures destinés à s'assurer que le système d'autocontrôles mis en place est efficace et, d'autre part, aux mesures prises pour s'assurer que ce système est correctement appliqué. Outre la planification du prélèvement d'échantillons destinés à vérifier l'efficacité des opérations de nettoyage et de désinfection, le système d'autocontrôles devra impliquer des observations, mesures ou tests complémentaires destinés à apporter la preuve qu'il est correctement mis en place et est efficace ;
- « conserver une trace écrite ou enregistrée des indications demandées conformément aux tirets précédents en vue de leur présentation aux services officiels ».

Cette trace écrite doit comporter deux types de documents :

- un document synthétique décrivant le système mis en place et comportant au moins :
- une description des produits,
- une description des procédés de fabrication de chaque produit avec l'indication des points critiques identifiés au cours de ceux-ci par l'industriel,
- pour chaque point critique, les dangers identifiés par le fabricant et les mesures préventives associées,
- les dispositions de surveillance et de contrôle,
- les procédures utilisées pour la vérification du respect des prescriptions de l'arrêté;
- tous les relevés d'observations et de mesures (diagrammes, barèmes, résultats d'analyses, etc.) correspondant à la mise en place de système d'autocontrôles.

Pour la mise en œuvre de ces dispositions, les professionnels ont le **choix des moyens** leur permettant de mettre en place un (des) système (s) d'autocontrôles répondant à ces objectifs. Pour cela, ils peuvent :

- pour la **conception** de ces systèmes, s'inspirer des principes de l'assurance qualité et/ou de la méthode HACCP;
- pour l'**application** particulière à leur secteur d'activité, utiliser les recommandations des guides de bonnes pratiques lorsqu'ils existent.

1.3. Hygiène du lait et des produits laitiers

1.3.1. Hygiène de la production et de la collecte du lait

Elle est réglementée par l'arrêté du 18 mars 1994 (paru au *JO* du 19 avril 1994).

1.3.1.1. État sanitaire des animaux

Le lait cru provient de vaches reconnues exemptes de tuberculose et de brucellose ou de chèvres indemnes de brucellose. Quelle que soit la nature de l'animal, il ne doit pas être en mesure de transmettre à l'homme de maladies contagieuses et doit présenter un bon état général (en particulier ne pas souffrir d'écoulements génitaux, de diarrhées ou d'inflammations du pis). Les animaux infectés sont isolés dans un local prévu pour cet usage.

1.3.1.2. Hygiène des locaux

Les locaux d'hébergement, de traite et d'entreposage du lait sont faciles à nettoyer, ils sont propres, nets, en bon état. Ils possèdent des sols permettant l'élimination des déchets dans de bonnes conditions. Leur accès est libre de toute accumulation des déjections ou autres substances, sources potentielles de contamination. En outre, les salles de traite sont pourvues d'un approvisionnement en eau potable suffisant pour les opérations de traite et de nettoyage du matériel, d'un dispositif destiné au lavage des mains et des bras, d'un éclairage et d'une ventilation suffisants. Les salles de traite sont séparées de toute source de contamination, les animaux sont hébergés dans des locaux distincts.

1.3.1.3. Hygiène de la traite, de la collecte et du transport

Les animaux sont tenus propres et bien soignés, notamment les trayons, la mamelle et les parties voisines de l'abdomen, de la cuisse et de l'aîne. Les équipements et ustensiles utilisés pour la traite sont, à tout moment, propres et entretenus. Après utilisation, ils sont nettoyés, désinfectés puis rincés à l'eau potable. Les récipients et citernes utilisés pour le transport du lait cru au centre de collecte sont nettoyés, désinfectés et rincés avant d'être réutilisés.

Immédiatement après la traite, le lait doit être ramené à une température ne dépassant pas 8°C lorsqu'il est collecté chaque jour et 6°C lorsque la collecte n'est pas effectuée chaque jour.

Pendant le transport, la chaîne du froid doit être maintenue et la température du lait ne doit pas dépasser 10°C à l'arrivée.

Ces conditions ne sont pas applicables lorsque le lait est traité dans les deux heures suivant la traite et si une température plus élevée est nécessaire pour des raisons technologiques, liées au processus de transformation (en particulier pour certains fromages).

1.3.1.4. Hygiène du personnel

Un parfait état de propreté est exigé du personnel. Les trayeurs se lavent les mains immédiatement avant la traite et les maintiennent propres tout au long de l'opération. Les lésions (écorchures, déchirures) sont recouvertes d'un pansement imperméable.

1.3.1.5. Critères à respecter

Lait cru de vache

Micro-organismes cultivant à 30°C < 100 000/cm³

Cellules somatiques < 400 000/cm³

Lait cru d'autres espèces

Micro-organismes cultivant à 30°C < 1500 000/cm³

Ces valeurs correspondent à une moyenne réalisée sur une période de deux mois avec au moins deux prélèvements par mois pour les micro-organismes, trois mois et un prélèvement mensuel pour les cellules somatiques.

Lait cru de vache utilisé pour préparer des produits laitiers	
- avant transformation	< 300 000/cm ³
- après transformation	< 100 000/cm ³
Lait cru d'autres espèces,	
destiné à la fabrication de produits laitiers	
au lait cru sans traitement thermique	< 500 000/cm ³

1.3.2. Réglementation des centres de collecte, de traitement et de transformation du lait et des produits laitiers

1.3.2.1. Dispositions concernant les conditions d'installation, d'équipement et de fonctionnement

Elles résultent de l'application du règlement CE n° 852/2004 et de l'arrêté du 30 décembre 1993 publié au *JO* du 11 janvier 1994.

• Aménagement des locaux

- Nécessité (sauf dérogations) de disposer de locaux distincts pour les activités de production, les activités de conditionnement et l'entreposage des produits.
- Disposition des locaux de nature à éviter toute contamination des produits alimentaires, en particulier les contaminations croisées.

L'équipement des locaux ne présente que peu de particularités par rapport aux règles générales précédemment énoncées.

• Hygiène du fonctionnement

Les conditions d'hygiène dans lesquelles sont réalisées toutes les opérations de production et de conditionnement font l'objet d'autocontrôles fondés sur les principes suivants (*article 13*):

- identification des étapes décisives pour la maîtrise de la salubrité des produits mis sur le marché, en fonction des procédés de fabrication utilisés dans l'établissement;
- surveillance et contrôle de ces étapes décisives selon des méthodes appropriées;
- prélèvement d'échantillons à analyser dans un laboratoire reconnu par le ministère de l'Agriculture et de la Pêche, aux fins de contrôle des méthodes de nettoyage et de désinfection et aux fins de vérification du respect des critères fixés par la réglementation;
- conservation d'une trace écrite ou enregistrée.

Un programme de formation du personnel à l'hygiène alimentaire, adaptée à l'activité de l'établissement, est mis en œuvre à l'initiative de l'employeur. Les services vétérinaires sont informés du contenu et de la mise en œuvre de ce programme.

• Procédures de nettoyage et désinfection

Les locaux dans lesquels se déroule la production sont nettoyés au moins une fois par jour de travail. De même, le matériel, les récipients et les installations entrant, pendant la production, en contact avec les denrées alimentaires périssables sont nettoyés et désinfectés à la fin de chaque cycle de production, au moins une fois par jour.

Le programme de nettoyage des autres locaux et celui des équipements, récipients et installations entrant en contact avec des denrées alimentaires microbiologiquement stables sont fondés sur l'analyse des risques (donc à l'initiative de l'établissement).

• Hygiène du personnel

Le plus parfait état de propreté est exigé du personnel qui doit porter des vêtements de travail appropriés et propres, ainsi qu'une coiffe enveloppant complètement la chevelure. Les blessures de la peau doivent être recouvertes d'un pansement étanche. Les autres mesures générales d'hygiène du personnel sont applicables à ce secteur très sensible (nettoyage régulier des mains, interdiction de fumer, manger, boire, cracher dans les locaux de travail).

2. Hygiène des locaux en restauration collective

2.1. Conceptions architecturales

2.1.1. Configuration des locaux

« Les locaux et leurs annexes doivent être de dimensions suffisantes pour que les activités professionnelles relatives à la confection des repas ou collations puissent s'y exercer dans des conditions d'hygiène convenables. La hauteur sous plafond doit être égale à 2,50 mètres dans les locaux neufs, 2,20 mètres dans les locaux anciens dont la ventilation est suffisante ».

(Arrêté du 26 octobre 1980, art. 14)

Les locaux et les postes de travail doivent être agencés de façon à :

- assurer la progression continue des différentes opérations ;
- respecter des circuits distincts pour :
 - l'arrivée des livraisons alimentaires,
 - la sortie des plats préparés,
 - l'évacuation des déchets,
 - le retour de la vaisselle à laver.

Ceci afin de respecter les deux principes essentiels que sont la marche en avant et le non chevauchement du secteur propre et du secteur souillé.

2.1.2. Impératifs concernant l'hygiène à respecter lors de l'aménagement des locaux

2.1.2.1. Les sols

Ils seront à la fois facilement lavables, antidérapants, résistants et en pente douce, de façon à permettre une bonne évacuation des eaux usées.

2.1.2.2. La surface des murs

Elle doit être lisse, étanche aux liquides, facile à nettoyer et à désinfecter sur une hauteur suffisante (au moins 1,75 mètre) et maintenue dans un bon état de propreté. Le raccordement entre le mur et le sol doit être en gorge arrondie.

2.1.2.3. L'aération

Il est important de disposer d'une bonne aération. Elle doit permettre un renouvellement de l'air d'une fréquence de 17 à 25 fois par heure en moyenne. C'est un élément de confort et de sécurité dans les cuisines, du fait de l'émission de vapeur d'eau qui augmente le degré hygrométrique et la chaleur (facteurs favorisant la multiplication des micro-organismes et désagréables pour le personnel). D'autre part, l'augmentation de l'humidité et de la chaleur accroissent les risques de court-circuit dans des locaux utilisant des combustibles particulièrement inflammables. L'air doit être filtré : à l'entrée, cela arrête les poussières ; à la sortie, la filtration retient les graisses et les poussières.

2.1.2.4. L'éclairage

Il doit être bien conçu, alliant un éclairage d'ambiance au plafond et des éclairages particuliers fixes ou orientables pour chaque plan de travail (environ 2 000 lumen par m²).

2.1.2.5. L'alimentation en eau chaude et froide

Elle doit être largement distribuée, en particulier pour les locaux où sont manipulées des denrées périssables, qui doivent être équipés pour le nettoyage du petit matériel.

2.1.2.6. L'évacuation des déchets

Elle est faite par un circuit spécial menant au quai d'évacuation. « Dans les cuisines et lieux de préparation des aliments, la collecte des déchets et détritiques doit être effectuée dans des sacs étanches à usage unique ou dans des récipients étanches munis de couvercles, affectés au seul usage de la cuisine et qui seront nettoyés et désinfectés avant leur réintroduction en cuisine. Les récipients contenant les déchets, rebuts ou détritiques de toutes sortes sont évacués des locaux de travail et placés dans des poubelles de voirie munies de couvercles, qui ne doivent jamais pénétrer en cuisine. Elles sont entreposées dans des locaux fermés, réservés à cet usage, distincts des réserves d'aliments, maintenus à une température aussi basse que possible, bien ventilés, à l'abri des insectes et des rongeurs, faciles à nettoyer et à désinfecter ».

2.1.2.7. Les circuits de stockage

Le plan architectural doit ménager à l'intérieur de la cuisine centrale des emplacements spéciaux pour :

- le circuit des viandes traitées en chambre froide avec :
 - l'arrivée des carcasses suspendues à un rail,
 - la préparation et le parage des pièces de viande,

- le stockage de la viande coupée,
- une chambre froide pour les viandes à consommer rapidement;
- le stockage des poissons entre 0 °C et +3 °C ou à –20 °C;
- la conservation des produits laitiers de 0 °C à +3 °C;
- la conservation des légumes frais et fruits à une température comprise entre +5 °C et +8 °C dans un local bien ventilé;
- le stockage de l'épicerie dans un local bien ventilé et éclairé;
- la chambre de conservation des produits surgelés (–20 °C) avec un système de dégivrage et une pièce de désurgélation où les produits sont entreposés la veille de leur consommation;
- un local (non chauffé) pour le stockage des conserves.

Ces indications concernent les cuisines de grand débit, la nature et le nombre des locaux dépendent de la dimension et de la nature de l'activité de l'établissement.

L'arrêté du 26 octobre 1980 est moins précis dans sa formulation. Il stipule que « les locaux de préparation et d'entreposage doivent être construits, agencés et équipés de telle façon que leurs températures soient compatibles avec la bonne conservation des denrées, des produits, quelle que puisse être la température extérieure » (article 4). Ces températures sont précisées à l'article 21 du même arrêté.

TABLEAU DES TEMPÉRATURES DIRIGÉES À RESPECTER POUR ASSURER UNE DURÉE DE VIE PLUS LONGUE ET UN MEILLEUR ÉTAT DE CONSERVATION AUX DENRÉES ALIMENTAIRES PÉRISSABLES

Nécessité de stocker les denrées alimentaires périssables à des températures dirigées spécifiques.

1) Froid positif

Le compartimentage d'ensembles froids réglés par thermostat permet d'éviter les souillures et les odeurs.

Température à respecter	Denrées	Compartimentage
Maximum +20 °C (2)	Conserves appertisées	
Maximum +15 °C	Charcuterie et produits stables, semi-conserves de produits de la pêche Fromages à pâte pressée cuite (Œufs)	
Maximum +10 °C	Toutes semi-conserves exceptées celles à base de produits de la pêche	
5 °C à +15 °C	Huîtres, moules, autres coquillages	Entreposés à part
6 °C à +10 °C	Fruits, légumes frais Boissons si nécessaire	Peuvent être entreposés ensemble mais à part Intérêt d'une cave fraîche
≤ 6 °C	Fromages à pâte molle, à pâte persillée Fromages frais	À défaut d'enceintes particulières, des emplacements distincts doivent être réservés à la conservation de ces denrées (à l'exception du gibier non dépouillé ou non plumé qui doit être entreposé à part). En ce cas, la température la plus basse nécessaire à la conservation de l'un des produits sera retenue.
0 °C à +6 °C	Produits laitiers frais non stérilisés	
0 °C à +4 °C	Conseillé pour les laits pasteurisés	
0 °C à +4 °C (2)	Volailles, lapins, gibier Produits de charcuterie non stables	
0 °C à +3 °C	Abats, viandes découpées de boucherie Pâtisserie, crèmes pâtisseries, plats froids Plats cuisinés	
0 °C à +2 °C	Viandes en morceaux de moins de 100 g, viandes hachées, préparations de viandes (arrêté du 28 septembre 1989)	Enceinte spécifique obligatoire Meuble froid des « sorties journalières »
0 °C à +2 °C sous glace	Poisson frais	

2) Froid négatif pour les denrées congelées ou surgelées

Température à respecter	Denrées	Compartimentage
– 12 °C – 12 °C (Art. du 28 septembre 1989)	Viandes congelées et à l'état congelé Viandes hachées, morceaux de moins de 100 g, préparations de viandes	Aucun compartimentage particulier n'est nécessaire à condition de choisir la température de conservation la plus basse.
– 12 °C	Abats, lapins, volailles, gibiers	
– 14 °C	Beurre	
– 18 °C	Toutes autres denrées congelées ou surgelées	
– 20 °C	Crèmes glacées, glaces (3)	

Les équipements en froid négatif sont destinés à conserver des produits surgelés ou congelés au stade industriel ou sur place avec une cellule de congélation. En l'absence de cette cellule, ils ne sont pas performants pour congeler et sont improprement appelés « congélateurs »; ce ne sont que des « conservateurs ».

(1) GPEM/DA : groupe permanent d'étude des marchés de denrées alimentaires.

(2) Le respect de cette température, non indiquée dans le fascicule 5542 du GPEM/DA, n'est pas obligatoire : il s'agit d'une valeur conseillée.

(3) Moindre recristallisation en cours de stockage.

2.1.2.8. Les vestiaires sanitaires

Ils sont réservés au personnel de cuisine, séparés de la cuisine par un sas, équipés de lavabos à commande non manuelle et d'essuie-mains à usage unique ou d'appareils à air chaud pulsé.

2.1.2.9. La plonge

Deux secteurs de plonge sont nécessaires: la plonge batterie, la laverie vaisselle.

Le secteur plonge doit être en bout de chaîne de préparation et ne pas recouper le circuit denrées propres et matériel propre.

2.2. L'entretien des locaux

Le sol est nettoyé et désinfecté après chaque séance de travail; le balayage à sec et l'utilisation de sciure sont interdits. Les murs, cloisons et plafonds, les filtres et les gaines de ventilation sont régulièrement entretenus.

Les chambres froides sont régulièrement débarrassées de toute souillure (nettoyage, rinçage) et désinfectées par pulvérisation sur les parois d'une solution détergente; les crochets sont brossés et trempés; les clayettes et les rayonnages sont fréquemment nettoyés.

2.3. Les salles microbiologiquement maîtrisées

L'objectif de ces installations est de maîtriser les paramètres exerçant une influence directe ou indirecte sur la qualité des produits qui y sont travaillés: poussières de l'air, micro-organismes et microparticules déposés sur les parois, le sol ou les équipements, contaminations liées à l'activité humaine dans l'enceinte, mais aussi hygrométrie, température et pression.

On parle de « salles blanches », « à empoussièremement contrôlé » ou encore « ultra-propres ».

L'aménagement d'une salle microbiologiquement maîtrisée s'inscrit dans le contexte global de maîtrise de la qualité. L'industrie laitière, les secteurs de la viande, de la charcuterie, des salaisons, des boissons, des plats cuisinés et des produits de la pêche font appel de plus en plus largement à cette technologie qui implique des procédures particulières appliquées avec rigueur, une adaptation du process et un comportement approprié du personnel.

Les normes de leur classification sont exprimées en particules par pied cube (ce volume représente 28 litres) ou par mètre cube d'air, selon que l'on se réfère aux normes américaines ou françaises.

	ΔP^*	Zone en activité		Degré de risque**	Qualité de l'air	
		Activités	Personnel		Classe Fed St/NF	Niveau global
Cuisine	0	Décartonnage Frigo stock denrées brutes Locaux déchets Stockage/manipulation denrées brutes	Dégagement, couloir d'accès	1	Non spécifiée mais propreté et hygiène maîtrisées	Gris
	+	Sorties frigo denrées brutes Enlèvement seconde protection Décontamination entrée Désemballage conditionnements vides (2 ^e enveloppe) Sortie/étiquetage produits finis conditionnés Laverie cuisine	Sas gris Sas intermédiaire Laverie	2	100 000/4 000 000	
SMM	++	Laverie de décontamination	Zone blanche personnel (travail sur postes 100/4 000) Sas blanc	3	10 000/400 000***	Blanc
		Stockage/manipulation denrées brutes avant déconditionnement final Stockage des conditionnements emballés avant utilisation			1 000/40 000	
	+++	Déconditionnement final Attentes, circuits Assemblage, tranchage Répartition Stockage conditionnements ouverts Conditionnement	4	100/4 000		

*: hiérarchie des pressions des locaux.

** : selon le guide GPEM Commission centrale des marchés.

*** : pendant les opérations de lavage avant décontamination, si la laverie se trouve dans la même salle que le conditionnement, les deux opérations ne doivent pas être simultanées.

Tableau 8 – Qualité de l'air requise selon la nature de l'activité (Document ASPEC, 1 cité du Paradis 75010 PARIS)

Norme américaine FS 209 D						Norme française NF X 44-101		
Classe	Particules en suspension – Nombre maximal par pied cube d'air ambiant (en fonction de leur taille en μm)					Classe	Particules en suspension (par m^3 d'air)	
	0,1 μm	0,2 μm	0,3 μm	0,5 μm	5 μm		0,5 μm	5 μm
1	35	7,5	3	1	0	–	–	–
10	350	75	30	10	0	–	–	–
100		750	300	100	0,7	4000	4000	25
1000				1000	7	–	–	–
10000				10000	70	400000	400000	2500
100000				100000	700	4000000	4000000	25000

Tableau 9 – Les normes de classification

Il n'existe pas de modèle type de salle microbiologiquement maîtrisée : chaque installation est adaptée à la nature de l'activité qui y est exercée.

Nous décrivons, ci-dessous, un exemple simple illustrant le principe général de leur fonctionnement.

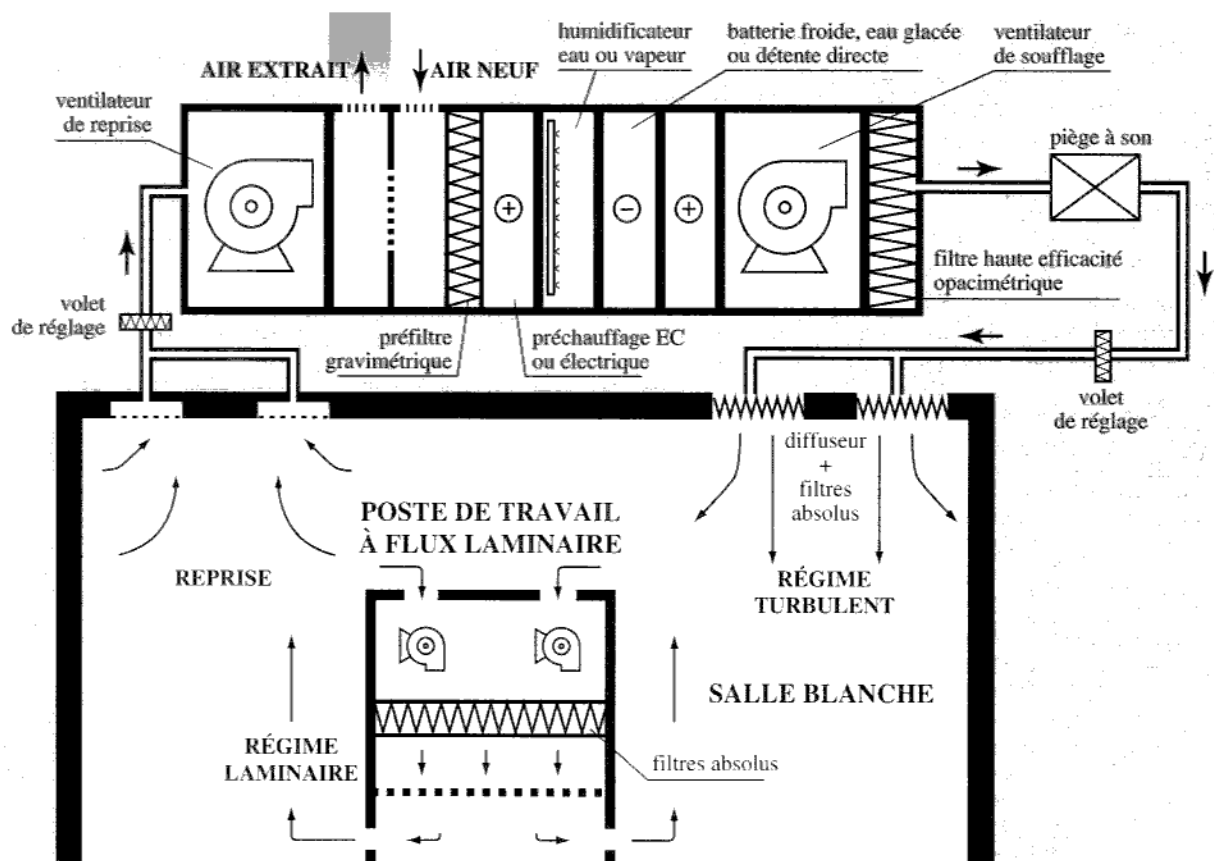


Fig. 3 – Conception générale d'un espace microbiologiquement maîtrisé (D'après un document EDF)

L'air repris à partir de la salle de travail est dirigé vers un caisson de mélange à trois voies (air neuf, air extrait, air recyclé) puis vers un préfiltre. Des batteries de préchauffage avec humidificateur, de refroidissement et de réchauffage ont pour fonction de l'amener à la température et à l'hygrométrie souhaitées. L'air passe alors dans un ensemble de filtres, un diffuseur le propulse dans la salle blanche sous la forme, par exemple, d'un flux turbulent.

Au niveau d'un poste de travail, l'air peut être repris par des dispositifs lui conférant les caractéristiques d'un flux laminaire.

2.3.1. Étude particulière des différents dispositifs et paramètres

2.3.1.1. Les filtres

La qualité de la filtration conditionne le niveau des performances obtenues. D'autre part, plus l'efficacité des filtres est importante, plus leur coût (achat + maintenance) est élevé. C'est pourquoi, la nature des filtres choisis est fonction du niveau d'hygiène attendu.

Les filtres absolus éliminent plus de 98 % des particules de 1 μm ou plus et 99,9 % des particules de 5 μm ou plus. Il est

établi qu'une poussière seulement sur 10^3 est statistiquement porteuse de micro-organisme(s). Les filtres absolus permettent donc de délivrer de l'air pratiquement stérile. Ils sont dits « de très haute efficacité ». Afin d'éviter que ces filtres ne s'obturent trop rapidement et soient changés trop fréquemment (chaque remplacement perturbe la production), des préfiltres sont installés en amont du circuit de l'air. Il existe aussi des filtres dégrossisseurs retenant les fibres textiles, les grains de pollens, les insectes, et des filtres fins retenant la plupart des poussières et des micro-organismes.

2.3.1.2. Le taux de brassage de l'air

Le taux de brassage de l'air représente le nombre de passages par unité de temps du volume total de l'air du local dans la centrale de traitement. Plus les performances de la salle blanche sont élevées, plus on filtre l'air et plus le taux de brassage est important.

Exemples : en classe 100 000, le taux de brassage est de 15 à 30 par heure ; en classe 1000, il est de 40 à 80 par heure ; en classe 100, il atteint 400 par heure.

2.3.1.3. Pression de l'air dans la salle

Afin de limiter les contaminations d'origine extérieure, les locaux sont maintenus en surpression. Ces pressions ne sont pas uniformes, les pressions les plus élevées sont appliquées aux zones les plus sensibles selon la règle dite « des cascades de pressions ».

2.3.1.4. Modes de diffusion de l'air

• Flux laminaire

Selon l'ASPEC, un flux laminaire est un « mouvement d'air provoqué, unidirectionnel et continu, dont la vitesse moyenne est généralement de 0,5 m/s et dont la carte des vitesses dans un plan perpendiculaire à sa direction présente des valeurs ne s'écartant pas de plus de 20 % de la moyenne générale ». Seules les zones sensibles de travail et celles où sont déposés des produits non protégés en attente de conditionnement sont équipées d'un tel dispositif, les coûts d'installation et d'exploitation étant élevés.

Les flux laminaires sont associés à des filtres absolus. Les particules émises par un individu ne peuvent contaminer leur environnement dont elles sont séparées par un rideau d'air. C'est le système le plus hygiénique et le plus coûteux.

• Flux turbulent

L'air est pulsé dans des directions quelconques assurant un brassage complet. Ce type de distribution peut être utilisé dans toutes les zones de moindre sensibilité et dans celles où sont entreposés des produits protégés.

Flux laminaire et flux turbulent peuvent être associés dans une même installation

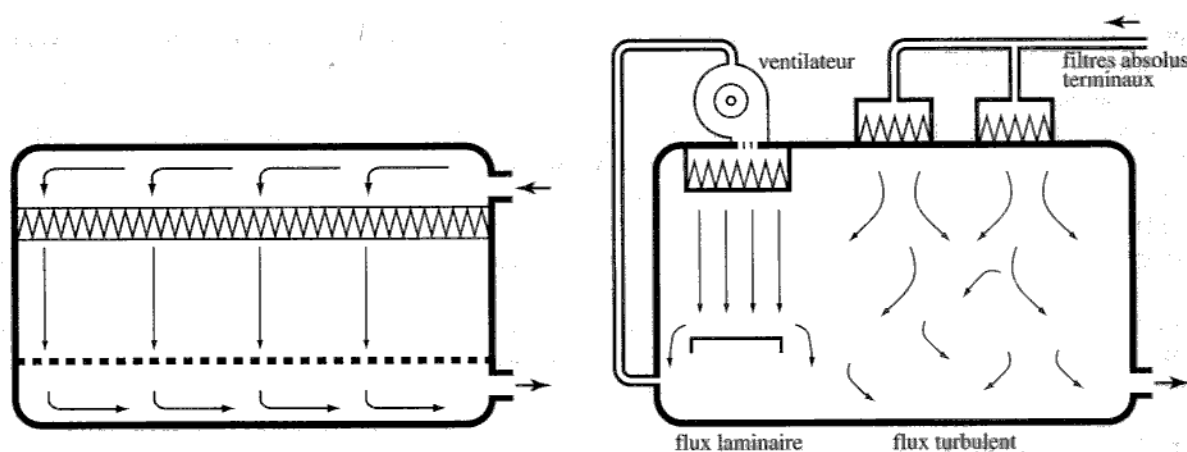


Fig. 4 – Flux laminaire - Flux laminaire et turbulent associés (Document EDF)

2.3.1.5. Les sas

Ce sont des zones de transit entre l'enceinte et l'extérieur : ils permettent l'entrée du personnel et l'introduction du matériel préparé préalablement, de façon à ce que leur propreté et leur protection soient compatibles avec la qualité de l'environnement de l'enceinte. Les sas séparent aussi des pièces soumises à des pressions différentes afin d'éviter des variations de pression lors de l'ouverture des portes.

Les rôles des sas apparaissent bien dans le schéma suivant, emprunté à l'ASPEC et représentant un espace microbiologiquement maîtrisé relativement complexe, adapté au conditionnement de denrées alimentaires sensibles.

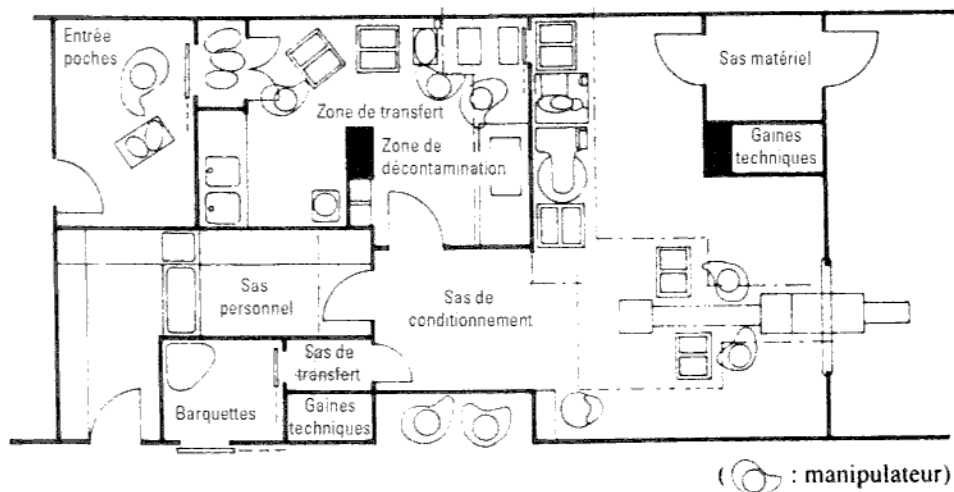


Fig. 5 – Plan d'une salle microbiologiquement maîtrisée (SMM) (Document ASPEC)

3. Hygiène du matériel en restauration collective

3.1. Bases théoriques

Les aliments se contaminent facilement par un transfert de bactéries présentes sur divers supports, tels les matériels, les mains, le linge, le matériel d'emballage...

Il est démontré aujourd'hui que les bactéries ne sont pas déposées de façon passive sur ces supports mais y adhèrent par la mise en jeu de leurs constituants les plus superficiels et certains produits de leur activité métabolique.

Le mécanisme de cette adhérence est connu, il se déroule en trois phases :

- une **phase d'attachement réversible**, au cours de laquelle les bactéries adhèrent au support par leurs fimbriæ (pili communs) ou d'autres structures de surface (acides lipotéichoïques chez les Gram+) ainsi que par des liaisons électrostatiques de type Van Der Waals ;
- une **phase d'attachement irréversible** qui est provoquée par la sécrétion par les bactéries d'une substance de nature polyosidique réunissant à la fois les bactéries entre elles et au support. Cette phase aboutit à la formation d'une mince pellicule très adhérente ;
- la **formation de microcolonies**, invisibles à l'œil nu.

Dès lors, la prolifération des bactéries à partir du support sera possible si elles y trouvent des nutriments et certaines conditions d'humidité. Toutes les anfractuosités : fissures, trous, crevasses, favorisent le maintien, après un nettoyage trop sommaire, à la fois de substances organiques, source de carbone pour les bactéries, et d'un micro-environnement humide. Dans tous les cas, elles rendent le nettoyage et la désinfection plus difficiles.

Signalons, enfin, que l'adhérence bactérienne est meilleure sur les supports hydrophobes (matières plastiques) que sur les supports hydrophiles (verre, métaux) et que les ions bivalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) favorisent cette adhérence (influence de la dureté de l'eau). Les détergents la rendent, par contre, plus difficile (rôle positif dans l'opération de nettoyage).

Ces données expliquent ou justifient les choix effectués par le législateur concernant la conception des matériels et les techniques mises en œuvre pour leur nettoyage et leur désinfection.

3.2. Les matériels

• Le gros matériel

Il comprend les machines utilisées en préparation :

- machines à préparer les légumes, à travailler la viande, à mélanger ou broyer les denrées... ;
- les gros récipients : marmites de cuisine, sauteuses... ;
- les fourneaux, fours à pâtisserie, autocuiseurs, grils, broches.

• Le petit matériel

Il est constitué des petits récipients (casseroles) et de nombreux ustensiles tels que ciseaux, couteaux, égouttoirs, machines à hacher...

• Les matériels divers

Cela peut être, par exemple :

- le mobilier;
- le matériel de manutention : tapis roulants, monte-plats, chariots, bacs.

3.2.1. Aptitude des matériels au nettoyage

La réglementation donne aux constructeurs, en accord avec leurs représentants, des directives pour proposer aux utilisateurs des matériels satisfaisant, par leur conception et leurs caractéristiques, aux exigences de l'hygiène en restauration collective.

Pour aller à l'essentiel :

- les **surfaces** sont **lisses**, afin que l'action mécanique du nettoyage soit pleinement efficace, **non poreuses** car les opérations de nettoyage et de désinfection n'ont, au fond des pores, qu'une efficacité partielle. Les surfaces extérieures d'un matériel doivent être facilement accessibles de façon à ce que le nettoyage puisse en être aisément effectué à la main;
- les **arrondis** doivent présenter un rayon minimum de 3,5 mm dans le cas du raccordement de deux surfaces, de 7,5 mm pour celui de trois surfaces;
- **toute cause de stagnation d'eau** dans un appareil **doit être évitée**; la conception de ces appareils doit être telle que l'écoulement des liquides s'effectue librement.

Du fait de l'importance des contraintes imposées aux fabricants et pour éviter une trop forte augmentation des coûts de production, les surfaces des appareils ont été classées en trois zones :

- la zone alimentaire est celle en contact direct avec les aliments. On réserve à cette zone l'application stricte des contraintes imposées par l'hygiène;
- la zone d'éclaboussures est susceptible de recevoir des projections de nature alimentaire;
- la zone non alimentaire n'est jamais au contact des aliments.

	Zone alimentaire	Zone d'éclaboussures	Zone non alimentaire
Surfaces	lisses (état de surface N 7 ⁽¹⁾ ou meilleur pour les métaux)	lisses (état de surface N 8 ⁽¹⁾ ou meilleur pour les métaux)	aussi lisses que possible (état de surface N 12 ⁽¹⁾ ou meilleur pour les métaux)
Angles	arrondis 2 plans $r \geq 3,5$ mm 3 plans $r 1 \geq 3,5$ mm $r 2 \geq 7,5$ mm	pas d'exigence	pas d'exigence
Assemblage des différentes surfaces d'un appareil	continuité assurée par soudure ou collage	– continuité assurée par soudure ou collage pour les plans horizontaux – ajustage ⁽²⁾ autorisé pour les plans verticaux ou inclinés (de plus de 10° sur l'horizontale) – vis et rivets facilement nettoyables autorisés	ajustage ⁽²⁾ autorisé dans tous les cas vis et rivets autorisés
Agencement de 2 ou plusieurs appareils	surfaces soudées ou collées en cas de continuité	– espace entre 2 appareils nettoyable – ou en cas d'assemblage, application des règles énoncées ci-dessus	– espace entre 2 appareils nettoyable – ou en cas d'assemblage, application des règles énoncées ci-dessus

(1) selon la norme NF E 05 051 : états de surfaces – échantillons de comparaison viso-tactile

(2) ajusté : deux surfaces sont ajustées lorsque la distance les séparant est inférieure ou égale à 0,8 mm

Tableau 10 – Exigences réglementaires pour les différentes zones (d'après la norme AFNOR U 60 - 010)

3.2.2. Entretien du matériel

Tous les matériels susceptibles d'être en contact avec les produits crus ou préparés à l'avance doivent être maintenus en parfait état d'entretien et de propreté. Les billots, planches à désosser ou à découper sont grattés, rabotés ou poncés et lissés aussi souvent que nécessaire. Les tables et matériels doivent être soigneusement nettoyés, désinfectés et rincés après utilisation. Les éléments démontables des appareils au contact avec les denrées, en particulier couteaux et grilles, et le petit matériel de tranchage sont, après utilisation, séparés, nettoyés, lavés, désinfectés et mis à l'abri de toute pollution jusqu'à la prochaine utilisation. Les différentes pièces sont rangées dans un endroit propre et ne doivent jamais reposer sur le sol. Le matériel nécessaire pour la préparation des pâtisseries, glaces ou crèmes glacées doit, après usage, être désinfecté soit par une ébullition suffisante, soit par immersion dans une solution d'antiseptique autorisé, puis rincé abondamment et séché. Les opérations de séchage et d'égouttage sont effectuées sans essuyage.

Les enceintes froides doivent être maintenues en constant état de propreté, dégivrées, désinfectées puis rincées aussi souvent que nécessaire. Le linge est changé fréquemment; il est tenu, avant son utilisation, dans un endroit propre réservé à cet effet. Le linge sale est disposé dans un meuble ou dans un récipient particulier, situé hors des cuisines ou des resserres à aliments.

4. Hygiène du personnel

4.1. Les examens médicaux

Leur nature et leur fréquence sont réglementées par l'arrêté du 10 mars 1977 qui concerne tout personnel appelé à manipuler des denrées animales ou d'origine animale. Le personnel des cuisines de collectivités entre donc dans son champ d'application.

- À l'entrée dans la profession ou à son retour après une absence de plus de six mois, sont obligatoires :
 - le dépistage par coproculture des porteurs sains de *Salmonella*, de *Shigella*, la recherche dans les selles de kystes ou formes végétatives d'amibes dysentériques ;
 - la recherche de *Staphylococcus aureus* dans la gorge et les fosses nasales ;
 - la recherche de streptocoques β hémolytiques du groupe A dans le pharynx.
- À l'entrée dans la profession, puis au moins une fois par an, est obligatoire un examen clinique destiné à vérifier que l'employé peut manipuler les denrées sans risque de les contaminer par des germes pathogènes. Sont particulièrement dépistées : les lésions cutanées purulentes (furuncle, anthrax...), les infections intestinales et respiratoires.

Toute personne présentant une maladie transmissible, ou porteuse de bactéries pathogènes ou de parasites, ne peut, jusqu'à guérison ou (et) élimination du portage, occuper un emploi la plaçant au contact des denrées alimentaires.

4.2. La tenue vestimentaire

Dès sa prise de service, le personnel doit passer par le vestiaire, y déposer ses vêtements de ville et mettre des vêtements propres de travail. La tenue en cuisine comprend :

- une coiffe enveloppant la totalité de la chevelure ; la coiffe est destinée à éviter que les cheveux et les poussières dont ils sont le support ne contaminent les plats ;
- une blouse à manches longues, de teinte claire (c'est un témoin de propreté) ;
- des chaussures antidérapantes.

Dans les locaux de conditionnement, le port des gants et du masque bucco-nasal est de rigueur.

4.3. La propreté des mains

Le lavage des mains avec un savon bactéricide à effet rémanent est indispensable :

- à chaque reprise de travail ;
- après l'usage des toilettes ;
- de façon générale, après toute opération susceptible de les contaminer (éplucher les légumes, éviscérer, effectuer des manipulations dans le local à pouelles, se moucher, gratter une blessure...).

C'est pourquoi il est indispensable de disposer de lave-mains à la porte des toilettes et à proximité de certains postes de travail (voir 2. *Hygiène des locaux*). Signalons, enfin, qu'il est interdit de fumer dans l'enceinte des cuisines et que les animaux domestiques n'y sont pas autorisés.

5. Établissement des procédures contribuant à la sécurité alimentaire : la méthode HACCP

Mise au point en 1970 aux États-Unis pour les industries chimiques, la méthode HACCP (Analyse des risques et points critiques pour leur maîtrise) est appliquée depuis 1972 dans le secteur de la conserverie. En 1989, l'OMS considère cette méthode comme la meilleure pour garantir la sécurité alimentaire. Le *Codex alimentarius* l'introduit et la directive 93/43 CE s'y réfère. Elle devient nécessaire dans la logique du système Qualité pour les normes ISO 9000.

5.1. Les quatre fonctions fondamentales de la logique HACCP

La logique HACCP conduit à identifier quatre missions ou « fonctions fondamentales » :

- 1 - l'analyse des dangers ;
- 2 - la maîtrise des points critiques ;
- 3 - la surveillance des conditions d'exécution ;
- 4 - la vérification de l'efficacité du système d'évaluation.

5.1.1. Analyse des dangers : définitions

• Point à risque

Un point à risque est un point où le niveau acceptable de contamination tend à être dépassé du fait des possibilités d'apports microbiens aléatoires ou systématiques, voire de leur persistance lorsque le point critique n'est pas maîtrisé.

• Points critiques (CCP)

Ce sont les points sur lesquels on peut agir pour maîtriser le risque. Un point critique est un point équipé d'un procédé qui permet de faire évoluer le risque de façon définie, répétable, évaluable, pour qu'il atteigne un niveau acceptable. Chaque point critique est donc déterminé, pour un micro-organisme donné, en fonction de sa nature, de sa fréquence, de la gravité et de la fréquence des affections qu'il entraîne chez le consommateur ou de celles des altérations de la denrée qu'il contamine.

5.1.2. Maîtrise des points critiques pour la salubrité des aliments

Elle consiste à fixer une **valeur cible**: « niveau de contamination dont l'évolution, même dans les conditions prévisibles les plus défavorables, ne lui permettra pas d'atteindre, au moment de l'utilisation, une valeur pour laquelle le danger est manifeste » (Professeur ROZIER).

5.2. Sept étapes à suivre pour la démarche concernant les aliments

La démarche HACCP peut être, pour la filière alimentaire, décomposée en sept étapes (après une étape préliminaire).

Étape	Objectifs de l'étape
Préliminaire	Constituer l'équipe HACCP, orienter son action, rechercher les informations, concevoir le développement de l'action.
1	Décrire le produit, le procédé de fabrication, identifier l'utilisation du produit. Vérifier, sur le site de production, le diagramme ainsi réalisé.
2	Analyser les dangers: pour chaque étape de fabrication, identifier les points à risque. Estimer les risques. Identifier et évaluer les mesures préventives.
3	Identifier les points critiques (CCP). Établir, pour chaque CCP, des valeurs cibles et des tolérances.
4	Établir, pour chaque CCP, un système de surveillance.
5	Définir les actions correctives à mettre en œuvre.
6	Définir les modalités de la vérification.
7	Établir un système documentaire approprié.

Tableau 11 – Filière alimentaire: les sept étapes de la démarche HACCP

5.3. Évaluer les risques d'apports et de multiplication des micro-organismes: les 5M

Pour chaque étape, on maîtrisera l'apport et la multiplication des micro-organismes en considérant les rôles respectifs de:

- la Matière, source d'apport initial et de contaminations croisées;
- le Milieu (locaux, air, eau, surfaces et biofilms);
- le Matériel (nature, conception, entretien);
- la Méthode, organisation du travail dans le temps et dans l'espace;
- la Main-d'œuvre (santé et comportement du personnel sur le plan de l'hygiène).

Voici un exemple de résultats fournis par une approche de ce type:

	Matière		Matériel		Méthode		Milieu		Main-d'œuvre	
	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M
Réception	X									
Stockage		X	x		x	X		X		
Préparation de la matière première	X		x		x	x		x		
Préparation de l'appareillage	x		X		x					
Opération broyage-malaxage-mélange			X						X	
Conditionnement après cuisson			x						X	
Conservation		X								
Réchauffage-présentation		X								

A = apport de micro-organismes
M = multiplication de micro-organismes
X = très important
x = important

Tableau 12 – Exemple d'évaluation des risques d'apports et de multiplication des micro-organismes: les 5M

6. Réglementation

L'arrêté du 29 septembre 1997 fixe les conditions d'hygiène applicables dans les établissements de restauration collective à caractère social. Il est paru au *Journal officiel* n° 247 de 23 octobre 1997.

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE

Arrêté du 29 septembre 1997 fixant les conditions d'hygiène applicables dans les établissements de restauration collective à caractère social

NOR: AGRG9700715A

Le ministre de la défense, le ministre de l'agriculture et de la pêche, le secrétaire d'Etat à la santé et le secrétaire d'Etat aux petites et moyennes entreprises, au commerce et à l'artisanat,

Vu la directive 93/43/CEE du Conseil du 14 juin 1993 relative à l'hygiène des denrées alimentaires;

Vu le code rural, et notamment ses articles 258 à 262;

Vu le code de la santé publique, et notamment ses articles L.1, L.11, L.12 et L.772;

Vu le code de la consommation;

Vu le décret n° 71-636 du 21 juillet 1971 pris pour l'application des articles 258, 259 et 262 du code rural et relatif à l'inspection sanitaire et qualitative des animaux vivants et des denrées animales ou d'origine animale, et notamment ses articles 3, 5, 7, 8, 25 et son article 26;

Vu le décret n° 84-1147 du 7 décembre 1984 modifié portant application de la loi du 1er août 1905 sur les fraudes et falsifications en matière de produits ou de services en ce qui concerne l'étiquetage et la présentation des denrées alimentaires;

Vu le décret n° 85-755 du 19 juillet 1985 relatif à l'hygiène, à la sécurité du travail et à la prévention au ministère de la défense;

Vu le décret n° 86-770 du 10 juin 1986 modifié fixant la liste des maladies à déclaration obligatoire;

Vu le décret n° 89-3 du 3 janvier 1989 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles;

Vu le décret n° 91-409 du 26 avril 1991 fixant les prescriptions en matière d'hygiène concernant les denrées, produits ou boissons destinés à l'alimentation humaine, à l'exclusion de ceux mentionnés aux articles 258, 259 et 262 du code rural, des eaux destinées à la consommation humaine et des eaux minérales naturelles, et notamment ses articles 2, 3, 4, 5, 10, 15, 19 et 20;

Vu le décret n° 91-685 du 14 juillet 1991 fixant les attributions du service de santé des armées, et notamment son article 1°;

Vu l'arrêté du 26 juin 1974 réglementant les conditions d'hygiène relatives à la préparation, la conservation, la distribution et la vente des plats cuisinés à l'avance;

Vu l'arrêté du 22 mars 1993 relatif aux végétaux et préparations de végétaux crus prêts à l'emploi destinés à la consommation humaine;

Vu l'arrêté du 28 juin 1994 relatif à l'identification et à l'agrément sanitaire des établissements mettant sur le marché des denrées animales ou d'origine animale et au marquage de salubrité;

Vu l'avis du Conseil supérieur d'hygiène publique de France,

Arrêtent:

Art. 1^{er}. - Le présent arrêté fixe les conditions sanitaires et hygiéniques auxquelles sont soumis les établissements publics ou privés assurant un service de restauration à caractère social, à titre gracieux ou onéreux, et dont au moins une partie de la clientèle est constituée d'une collectivité de consommateurs réguliers.

Sont notamment concernés les restaurants liés à une administration ou une entreprise, les restaurants à caractère interadministratif ou interentreprise, les restaurants scolaires, universitaires ou liés à tout établissement d'enseignement, les restaurants des hôpitaux, cliniques, établissements à caractère sanitaire et social et les restaurants de toute structure d'accueil des personnes âgées, crèches, foyers d'accueil et de bienfaisance, camps, centres et établissements de vacances et établissements pénitentiaires. Les cuisines approvisionnant ces restaurants sont également visées par ce texte.

Art. 2. - Pour l'application du présent arrêté, il faut entendre par:

1. Cuisine centrale: établissement dont une partie au moins de l'activité consiste en la fabrication de préparations culinaires élaborées

à l'avance à destination d'au moins un restaurant satellite ou d'une collectivité de personnes à caractère social.

2. Restaurant satellite: établissement ou local aménagé desservi par une cuisine centrale.

3. Conditionnement: opération destinée à réaliser la protection des denrées alimentaires, par l'emploi d'une première enveloppe ou d'un premier contenant au contact direct de la denrée ainsi que cette première enveloppe ou ce premier contenant lui-même.

4. Déconditionnement: opération destinée à supprimer la première enveloppe ou le premier contenant placé au contact direct des denrées alimentaires.

5. Reconditionnement: opération destinée à réaliser la protection de certaines denrées alimentaires à la suite d'un déconditionnement, par l'emploi d'une nouvelle première enveloppe ou d'un nouveau premier contenant au contact direct de la denrée. Toutefois, une telle opération, lorsqu'elle est conjointe à l'allotissement (conditionnement-allotissement), n'est pas considérée comme un reconditionnement.

6. Préparation culinaire élaborée à l'avance: préparation culinaire élaborée par un établissement de restauration collective, dont la stabilité n'est pas assurée et dont la consommation:

a) Est remise à un service ultérieur à celui qui suit son élaboration;

b) Sans être remise à un service ultérieur, a lieu en dehors des locaux attenants à la cuisine.

Lorsque ces préparations sont conservées par le froid, il s'agit d'un service en liaison froide; lorsqu'elles sont conservées par la chaleur, il s'agit d'un service en liaison chaude.

Sans préjudice des conditions de conservation qui lui sont propres, la stabilité d'une préparation culinaire est considérée comme assurée dans les cas suivants:

a) Soit la valeur de l'activité de l'eau (Aw) est inférieure ou égale à 0,95 et le pH inférieur à 5,2;

b) Soit la valeur de l'activité de l'eau (Aw) est inférieure ou égale à 0,91;

c) Soit le pH est inférieur à 4,5.

Art. 3. - Toute personne responsable d'un établissement mentionné à l'article 1^{er} est tenue d'en faire la déclaration au préfet du département (directeur des services vétérinaires) dans lequel est situé l'établissement.

Cette déclaration est établie en double exemplaire sur un imprimé conforme au modèle défini dans l'annexe III pour cette activité, préalablement à l'ouverture de l'établissement. Elle est complétée, le cas échéant, par les documents prévus par les articles 47 et 48. Elle doit être renouvelée à chaque changement d'exploitant ou lors de toute modification importante dans l'aménagement, l'équipement ou l'utilisation des locaux.

Il est délivré, sans frais, un récépissé de cette déclaration, qui doit être présenté à toute réquisition des agents des services officiels de contrôle.

Pour un organisme placé sous l'autorité ou la tutelle du ministre de la défense, la déclaration est faite au directeur du service de santé des armées de la région d'implantation de cet organisme.

Art. 4. - Les responsables des établissements mentionnés à l'article 1^{er} peuvent se référer comme moyen d'application du présent arrêté à un guide de bonnes pratiques hygiéniques validé conformément à la procédure publiée au *Journal officiel* de la République française du 24 novembre 1993, notamment en ce qui concerne l'analyse des risques

prévue à l'article 5 ou les études de vieillissement prévues aux articles 40 et 42. Les administrations compétentes prennent en considération sa mise en œuvre par les établissements concernés pour l'organisation et la fréquence du contrôle.

Art. 5. - Les responsables des établissements mentionnés à l'article 1er doivent procéder à des autocontrôles réguliers afin de vérifier la conformité des installations et du fonctionnement de leurs établissements aux dispositions du présent arrêté, ainsi que la conformité des matières premières et produits finis aux critères microbiologiques réglementaires auxquels ils doivent satisfaire, lorsqu'ils existent.

Ces autocontrôles doivent notamment porter sur les produits à réception, les conditions de transport et de conservation des aliments, les couples temps-température appliqués aux produits tout au long de leur élaboration, aux points et à la fréquence où l'analyse des risques les a rendus nécessaires.

Pour établir la nature et la périodicité des autocontrôles, ils doivent identifier tout aspect de leurs activités qui est déterminant pour la salubrité des aliments, et veiller à ce que des procédures écrites de sécurité appropriées soient établies, mises en œuvre, respectées et mises à jour en se fondant sur les principes utilisés pour développer le système dit HACCP (analyses des risques, points critiques pour leur maîtrise), en particulier :

1. Analyser et évaluer les risques alimentaires potentiels d'une opération.
2. Mettre en évidence les niveaux et moments (les « points ») de l'opération où des risques alimentaires peuvent se présenter.
3. Etablir lesquels de ces points sont critiques pour la salubrité des aliments (les « points critiques »).
4. Définir et mettre en œuvre, au niveau de chacun de ces points critiques, des procédures de contrôle permettant de s'assurer de leur maîtrise effective.
5. Définir les actions correctives à mettre en œuvre lorsqu'un contrôle révèle qu'un point critique n'est plus maîtrisé ou n'a pas été maîtrisé à un moment donné.
6. Définir et mettre en œuvre des procédures spécifiques de vérification et de suivi de l'efficacité de l'ensemble des procédures ainsi mises en place.
7. Revoir périodiquement, et à chaque modification de l'opération étudiée, l'analyse des risques alimentaires, les points critiques ainsi que leurs procédures de vérification et de suivi.

Pour chacun des risques alimentaires potentiels qui sont mis en évidence, des mesures préventives relevant des bonnes pratiques d'hygiène sont mises en œuvre.

Les procédures utilisées, dûment documentées, justifiant de l'application du présent arrêté sont conservées à la disposition des services officiels lors du contrôle.

TITRE I^{er} DISPOSITIONS GÉNÉRALES

Chapitre I^{er}

Implantation, aménagement et équipement des locaux

Art. 6. - Par leur implantation, leur conception, leurs dimensions, leur construction et leur agencement, les locaux dans lesquels circulent les denrées alimentaires, ainsi que l'équipement en matériels de ces locaux, doivent :

- a) Permettre le stockage des différentes denrées alimentaires (matières premières, produits semi-élaborés, produits finis) dans des conditions d'ambiance, notamment de température et d'hygrométrie, compatibles avec leur bonne conservation ;
- b) Ne pas constituer par eux-mêmes, notamment du fait des matériaux qui les composent, une source de contamination pour les aliments ;
- c) Faciliter les opérations de nettoyage et de désinfection de leurs différentes surfaces et, de ce fait, contribuer à réduire à un niveau acceptable les risques de contamination des denrées alimentaires ;
- d) Permettre de prévenir l'encrassement, le contact avec des matériaux ou fluides toxiques, le déversement de particules dans les denrées

alimentaires et le développement de moisissures ou la formation de condensation indésirable sur les surfaces ;

e) Ne pas offrir, lors du travail des denrées alimentaires, de conditions d'ambiance favorables à la multiplication des micro-organismes, notamment par une séparation suffisante des opérations relevant des secteurs chauds et des secteurs froids, sauf si l'analyse des risques prévue à l'article 5 montre que la maîtrise de ces opérations offre la même sécurité pour la santé du consommateur ;

f) Permettre la progression continue et rationnelle dans l'espace des différentes opérations élémentaires conduisant à l'élaboration des produits finis (marche en avant dans l'espace), à moins que ne soient clairement définies, mises en œuvre et respectées des procédures de fonctionnement spécifiques palliant effectivement cette conception des locaux (marche en avant dans le temps) ;

g) Permettre la mise en œuvre de bonnes pratiques d'hygiène, notamment en prévenant les sources de contamination extérieures, tels les animaux domestiques, les plantes, les insectes, les rongeurs et autres animaux nuisibles, et en évitant la contamination croisée entre les denrées alimentaires, les équipements, les matériels, les matériaux, l'eau, l'aération, le personnel, en particulier par une séparation suffisante entre les secteurs propres et les secteurs souillés.

Art. 7. - Pour répondre aux dispositions de l'article 6 ci-dessus, tout établissement mentionné à l'article 1er doit comporter au minimum :

a) Des toilettes en nombre suffisant pour le personnel de cuisine, comprenant des cabinets d'aisances à cuvettes dites « à l'anglaise », raccordées à un système d'évacuation efficace et équipées de distributeurs de papier hygiénique approvisionnés en permanence, ne donnant pas directement sur les locaux dans lesquels circulent les denrées alimentaires ;

b) Des locaux servant de vestiaires, suffisamment spacieux et réservés à l'usage du personnel agencés et conçus de manière à éviter les risques de contamination des tenues de travail ;

c) Un système général d'évacuation des eaux usées et des eaux pluviales, suffisant et efficace, conçu et construit de manière à éviter tout risque de contamination des denrées alimentaires ;

d) Un système de ventilation adéquat et suffisant des locaux, que cette ventilation soit naturelle ou mécanique, conçu de manière à faciliter l'accès aux filtres à air et aux autres éléments devant être nettoyés ou remplacés et, en tout état de cause, permettant d'éviter tout flux d'air pulsé d'une zone contaminée vers une zone propre ;

e) Un éclairage suffisant et adapté des locaux ;

f) Dans les différents locaux où sont manipulées les denrées alimentaires ainsi qu'à la sortie des toilettes du personnel, un nombre suffisant de lave-mains à commande non manuelle judicieusement situés, alimentés en eau courante chaude et froide et équipés de distributeurs de savon et d'essuie-mains hygiéniques ;

g) Des équipements frigorifiques adaptés, de capacité suffisante au regard de l'activité de l'établissement et équipés au moins de thermomètres à lecture directe et, pour les chambres froides de plus de 10 mètres cubes, de systèmes d'enregistrement adéquats ;

h) Au besoin, des équipements de maintien en température des plats chauds ;

i) Des systèmes hygiéniques de collecte et d'évacuation des déchets, équipés au besoin de commande non manuelle pour leur ouverture et de sacs étanches à usage unique ; et, pour les locaux où les denrées alimentaires sont stockées, préparées, traitées ou transformées ainsi que pour les locaux où le matériel au contact direct des denrées est lavé ou/et entreposé ;

j) Des revêtements de sol faciles à nettoyer et à désinfecter constitués de matériaux étanches, non absorbants, résistants aux chocs, imputrescibles, de couleur claire, lavables et non toxiques ;

k) Au besoin, des dispositifs d'évacuation des eaux de lavage efficaces ;

l) Des surfaces murales faciles à nettoyer et à désinfecter, constituées de matériaux étanches, non absorbants, résistants aux chocs, de couleur claire, imputrescibles, lavables, non toxiques, et présentant une surface lisse ;

m) Des angles d'intersection entre le sol et les surfaces murales permettant le maintien en permanence de l'état de propreté ;

n) Des portes faciles à nettoyer, en matériaux lisses et non absorbants, résistant aux chocs, lavables et imputrescibles ;

o) Des fenêtres et autres ouvertures conçues de manière à prévenir l'encrassement et, au besoin, lorsqu'elles donnent sur l'environnement extérieur, équipées de systèmes de protection contre les insectes qui doivent pouvoir être facilement enlevés pour le nettoyage;

p) Des plafonds, faux plafonds et autres équipements suspendus conçus et construits de manière à permettre le maintien en permanence de l'état de propreté et à réduire la condensation, empêcher le développement de moisissures et le déversement de particules sur les denrées ou les surfaces susceptibles d'entrer en contact avec les denrées.

Art. 8. - De manière générale, les différentes surfaces susceptibles d'entrer en contact avec les aliments sont faciles à nettoyer et à désinfecter, constituées de matériaux lisses, de couleur claire, impurescibles, lavables et non toxiques. Tous les matériels et équipements avec lesquels les denrées alimentaires entrent en contact doivent être maintenus en permanence propres et :

a) Construits et entretenus de manière à éviter les risques de contamination des denrées alimentaires;

b) Construits et entretenus de manière à permettre un nettoyage efficace et, lorsque cela s'avère nécessaire pour éviter la contamination des aliments, une désinfection adaptée

c) Installés de manière à permettre le nettoyage de la zone environnante.

Art. 9. - L'alimentation des locaux en eau potable doit être suffisante et répondre à la réglementation en vigueur. En particulier, tous les éviers ou autres dispositifs semblables de lavage des aliments doivent disposer d'une alimentation suffisante en eau potable, chaude et/ou froide selon les besoins et en rapport avec l'activité.

L'eau non potable utilisée pour la production de vapeur, l'alimentation des groupes frigorifiques, la lutte contre l'incendie et à d'autres fins semblables doit circuler dans des réseaux séparés, sans contact avec les denrées alimentaires, facilement identifiables et sans raccordement avec les systèmes d'eau potable ni possibilité de reflux dans ces mêmes systèmes.

Chapitre II

Utilisation et entretien des locaux et du matériel, gestion des déchets

Art. 10. - Afin de limiter tout risque de contamination, les locaux dans lesquels circulent les denrées alimentaires ainsi que l'ensemble de leur équipement en matériels doivent être maintenus propres et en bon état d'entretien permanent. Dans les locaux où les denrées alimentaires sont manipulées, préparées ou entreposées non conditionnées, l'utilisation de sciure et le balayage à sec sont interdits, ainsi que l'emploi de tout produit et tout procédé de nettoyage ou de désinfection inadapté.

Art. 11. - Il est interdit d'utiliser les locaux ou les équipements d'entreposage et de préparation des aliments à d'autres fins que celles prévues sur la déclaration mentionnée à l'article 3. Il est interdit de fumer et de manger dans tous les locaux d'entreposage ou de manipulation des denrées et dans ceux utilisés pour les opérations de nettoyage.

Art. 12. - Un plan de nettoyage et de désinfection de l'ensemble des locaux, y compris des vestiaires et des sanitaires, et du matériel est défini par écrit de façon claire et précise, conformément aux dispositions de l'article 5. Pour chacun des équipements et des différentes parties des locaux, ce plan comprend au moins les indications suivantes :

a) La fréquence et les moments de la journée auxquels les différentes opérations de nettoyage et de désinfection sont effectuées;

b) Le mode opératoire précis comportant notamment, pour chaque produit utilisé, la dilution, la température d'utilisation, le temps d'application et la nécessité d'un rinçage éventuel;

c) Le responsable des opérations de nettoyage et de désinfection pour chaque secteur;

d) Les moyens mis en place pour vérifier l'efficacité du plan.

Art. 13. - Des méthodes, des produits et des équipements appropriés sont utilisés pour lutter contre les insectes, les rongeurs et autres animaux nuisibles.

Les substances et préparations dangereuses, notamment les insecticides, les rodenticides et les désinfectants, doivent être entreposés dans des réserves ou meubles fermant à clef, parfaitement identifiés et spécialement affectés à cet usage. Les produits et le matériel d'entretien et de nettoyage doivent être entreposés dans un meuble ou un local spécialement affecté à cet usage.

Les méthodes, équipements, matériels et produits visés dans cet article ne doivent en aucun cas constituer un risque de pollution des denrées.

Art. 14. - Les déchets alimentaires et les autres types de déchets sont stockés en dehors des locaux de conservation et de manipulation des denrées, dans des conteneurs équipés de couvercles. Ces conteneurs sont conçus dans l'objectif d'être faciles à entretenir, à nettoyer et à désinfecter. Si nécessaire, ils sont entreposés dans un local fermé réservé à cet usage et au besoin réfrigéré. Des dispositions appropriées doivent être prises pour assurer une évacuation régulière et suffisamment fréquente des déchets qu'ils contiennent.

En tout état de cause, les conditions d'entreposage des déchets de l'établissement avant leur évacuation ne doivent pas constituer une source d'insalubrité pour le voisinage ou pour l'établissement lui-même. Ainsi, les zones de stockage des conteneurs sont conçues et gérées de manière à les maintenir propres en permanence. Toute mesure adaptée est prise pour éviter que les déchets ne puissent contaminer les denrées alimentaires, l'eau potable, les équipements et les locaux, et pour empêcher l'accès aux insectes, rongeurs et autres animaux, nuisibles ou non.

Chapitre III

Hygiène des opérations portant sur les denrées alimentaires

Art. 15. - Les responsables des établissements mentionnés à l'article 1er, ou leurs délégataires, prennent toutes les mesures nécessaires pour s'assurer que les denrées alimentaires qui transitent au sein de leurs établissements, que ce soit au moment des opérations de livraison, d'entreposage, de manipulation, de préparation, de commercialisation, de transport, de distribution ou de remise au consommateur, sont conformes aux dispositions réglementaires en vigueur.

En outre, pour les denrées animales ou d'origine animale dont les établissements d'origine sont soumis à l'agrément sanitaire instauré par l'article 260 du code rural, ils s'assurent que leurs fournisseurs sont agréés et que les emballages des denrées sont bien revêtus des marques de salubrité lorsque celles-ci sont prévues par la réglementation, ou, lorsqu'une dispense existe pour une catégorie de denrées, ils vérifient que l'établissement d'origine des denrées concernées est effectivement dispensé.

Art. 16. - Les denrées alimentaires sont conservées dans des conditions permettant d'en éviter toute altération ou toute détérioration, notamment en les maintenant à des températures inférieures ou égales à celles figurant en annexe du présent arrêté. Toutes les denrées alimentaires qui sont stockées, manipulées, conditionnées, transportées ou exposées doivent être protégées contre toute contamination susceptible de les rendre impropres à la consommation humaine.

Art. 17. - Toutes les manipulations ou opérations portant sur les denrées alimentaires doivent s'effectuer en limitant les risques de contamination et de développement de micro-organismes pathogènes ou de formation de toxines à des niveaux susceptibles d'entraîner un danger pour la santé. Pour cela, il convient de mettre en place et d'appliquer des règles d'hygiène spécifiques dont l'efficacité est contrôlée conformément aux dispositions de l'article 5.

Art. 18. - La décongélation des denrées alimentaires se fait à l'abri de toute contamination. La durée de vie des denrées décongelées ne peut excéder quatre jours, y compris le jour de la mise en décongélation.

Art. 19. - Les préparations culinaires destinées à être conservées par la chaleur jusqu'au moment de leur consommation sont, dès la fin du dernier traitement thermique, maintenues à une température supérieure ou égale à + 63 °C, sauf si l'analyse des risques prévue à l'article 5 montre qu'une température inférieure n'entraîne pas de risque pour la santé du consommateur.

Document 4 – Arrêté du 29 septembre 1997

fixant les conditions d'hygiène applicables dans les établissements de restauration collective à caractère social

Art. 20. - Lorsque des préparations culinaires nécessitent un début de traitement tel que braisage, rôtissage, rissolage, friture, blanchiment, pochage, ébullition prolongée, précuisson, cette opération ne peut être effectuée au plus tôt que la veille de leur consommation et doit être suivie, lorsqu'elle a été réalisée, d'un refroidissement rapide.

De même, les préparations culinaires destinées à être conservées par le froid doivent être rapidement refroidies après le dernier stade de traitement thermique ou, en l'absence de traitement thermique, après le dernier stade de leur élaboration.

Art. 21. - Le refroidissement rapide des denrées est opéré de telle manière que leur température à cœur ne demeure pas à des valeurs comprises entre + 63 °C et + 10 °C pendant plus de deux heures, sauf si l'analyse des risques prévue à l'article 5 a prouvé qu'un refroidissement moins rapide reste suffisant pour garantir la salubrité des denrées. Après refroidissement, ces denrées sont conservées dans une enceinte dont la température est comprise entre 0 °C et + 3 °C.

Art. 22. - La remise en température des préparations culinaires à servir chaudes est opérée de telle manière que leur température ne demeure pas pendant plus d'une heure à des valeurs comprises entre + 10 °C et la température de remise au consommateur. En tout état de cause, cette température ne peut être inférieure à + 63 °C, sauf si l'analyse des risques prévue à l'article 5 a montré qu'une température inférieure n'entraîne pas de risque pour la santé du consommateur. Ces préparations culinaires doivent être consommées le jour de leur première remise en température.

Art. 23. - Les préparations culinaires destinées à être consommées froides sont refroidies rapidement, le cas échéant, et entreposées dès la fin de leur élaboration et jusqu'à l'utilisation finale dans une enceinte dont la température est comprise entre 0 °C et + 3 °C.

Ces préparations culinaires sont retirées de cette enceinte au plus près de la consommation, dans un délai maximum de deux heures sous réserve que le produit soit maintenu à une température inférieure ou égale à + 10 °C, sauf si l'analyse des risques prévue à l'article 5 montre qu'un autre couple temps/température offre le même niveau de sécurité pour les consommateurs.

Art. 24. - La fabrication sur place de viandes hachées crues, destinées à la cuisson, ne doit pas intervenir plus de deux heures avant consommation. Pendant cette période, si elle n'est pas cuite immédiatement, elle est conservée à l'abri des contaminations dans une enceinte dont la température est comprise entre 0 °C et + 3 °C.

Art. 25. - La récupération des denrées et des boissons déjà servies au consommateur est interdite, à l'exception de celles qui n'ont pas été déconditionnées et qui se conservent à température ambiante.

Les excédents des plats prévus au menu du jour, non servis au consommateur, peuvent être représentés le lendemain, pour autant que leur salubrité soit assurée et sous la condition impérative de la mise en place de procédures d'autocontrôles spécifiques et de la mise en œuvre d'un moyen efficace d'identification de la date de fabrication des plats correspondants.

Les dispositions du deuxième alinéa du présent article ne s'appliquent pas dans les restaurants satellites, à l'exception des préparations culinaires à consommer froides qui n'ont pas été déconditionnées et ont été maintenues, jusqu'à leur utilisation finale, dans une enceinte dont la température est comprise entre 0 °C et + 3 °C, sans rupture de la chaîne du froid.

Art. 26. - Lorsque de la glace doit être utilisée pour la préparation de certains produits ou pour leur maintien en température, cette glace est fabriquée à partir d'eau potable, puis manipulée et stockée dans des conditions prévenant toute contamination directe ou indirecte des denrées alimentaires.

Chapitre IV

Dispositions relatives au personnel

Art. 27. - Afin d'éviter toute contamination de la part du personnel, toute personne travaillant dans une zone de manipulation de denrées

alimentaires doit respecter un niveau élevé de propreté corporelle et porter des vêtements de travail propres et adaptés. A l'exception de la zone de distribution, ces vêtements sont de couleur claire et comprennent notamment des chaussures réservées au travail et une coiffe englobant l'ensemble de la chevelure. La tenue comprend, au besoin, le port du masque bucco-nasal et l'utilisation correctement maîtrisée des gants à usage unique.

Le responsable de l'établissement est tenu de prendre les mesures nécessaires afin que le passage de toute autre personne appelée, à quelque titre que ce soit, à pénétrer dans les locaux où les denrées alimentaires sont préparées, traitées ou transformées ne puisse constituer une source de contamination pour les denrées ou leur environnement.

Art. 28. - Aucune personne reconnue atteinte d'une maladie susceptible d'être transmise par les aliments n'est autorisée à travailler dans une zone de manipulation de denrées alimentaires, à quelque titre que ce soit, dès lors qu'il existe de ce fait un risque de contamination directe ou indirecte des aliments par des organismes pathogènes.

Tout membre du personnel appelé à manipuler des denrées alimentaires doit avoir été déclaré apte à effectuer ces manipulations. Le responsable de l'établissement veille à ce que cette aptitude soit attestée médicalement chaque année dans le respect de la réglementation spécifique en vigueur.

Art. 29. - Le responsable de l'établissement veille à ce que les personnes appelées à travailler dans les locaux dans lesquels circulent des denrées alimentaires suivent des instructions précises leur permettant d'appliquer les dispositions du présent arrêté. Ces personnes suivent une formation continue à l'hygiène alimentaire, adaptée aux besoins de chaque catégorie de personnel et aux contraintes spécifiques des installations.

Il s'assure que les effectifs en personnel sont suffisants pour permettre un fonctionnement optimal de l'établissement au plan de l'hygiène.

Chapitre V

Hygiène des salles de restaurant et des locaux similaires

Art. 30. - Les salles de restaurant et les locaux similaires ne doivent pas, du fait de leur aménagement ou de l'usage qui en est fait, constituer un risque d'insalubrité pour les denrées.

La présence d'animaux de compagnie y est interdite, à l'exception des chiens guides d'aveugles.

Les murs, plafonds, cloisons et sols, ainsi que l'ameublement, sont maintenus en bon état de propreté permanent. Le nettoyage ou le lavage du sol est effectué au minimum après chaque journée de travail.

Les ustensiles susceptibles de se trouver au contact des aliments et de l'eau de boisson sont tenus en parfait état de propreté et changés aussi souvent que nécessaire.

Les toilettes des consommateurs, comprenant cabinets d'aisances et lavabos, sont maintenues en constant état de propreté et de bon fonctionnement. Elles sont pourvues en permanence de papier hygiénique et les cabinets d'aisances, équipés de chasse d'eau, ne doivent jamais communiquer directement avec la salle où sont servies les préparations culinaires, ni avec les locaux dans lesquels circulent des denrées alimentaires. Elles ne doivent pas être accessibles par la cuisine.

Art. 31. - En libre service, les meubles de distribution des plats sont aménagés de façon que les aliments proposés soient tenus à l'abri des souillures et que les manipulations indésirables de la part des consommateurs soient limitées.

Les préparations culinaires destinées à être servies froides présentées en libre service doivent l'être conformément aux dispositions de l'article 23.

Chapitre VI

Dispositions spécifiques relatives aux toxi-infections alimentaires collectives

Art. 32. - Les responsables des établissements mentionnés à l'article 1er conservent des plats témoins à la disposition exclusive des

services officiels de contrôle. Ces plats témoins sont des échantillons représentatifs des différents plats distribués aux consommateurs, clairement identifiés, prélevés en suffisamment grande quantité pour permettre leur analyse microbiologique et, le cas échéant, chimique, dans les meilleures conditions possible. Ils doivent être conservés pendant au moins cinq jours après la dernière présentation au consommateur, dans des conditions non susceptibles de modifier leur qualité microbiologique.

Art. 33. - Dès qu'il en a connaissance, le responsable d'un établissement est tenu de signaler au directeur départemental des affaires sanitaires et sociales, conformément au décret no 86-770 du 10 juin 1986 susvisé, ainsi qu'au directeur des services vétérinaires toute survenue, parmi les consommateurs fréquentant son établissement, d'au moins deux cas groupés de symptomatologie similaire qui pourraient être rapportés à une origine alimentaire commune.

Afin de faciliter l'enquête des services officiels, le responsable de l'établissement tient à leur disposition les renseignements nécessaires à l'enquête épidémiologique, notamment les menus comprenant les denrées effectivement servies ainsi que les plats témoins des repas ayant précédé la survenue des symptômes.

Pour un organisme placé sous l'autorité du ministre de la défense, la déclaration est faite par le médecin de collectivité de l'hôpital des armées de rattachement, d'une part; au directeur départemental des affaires sanitaires et sociales concerné et, d'autre part, au chef de groupe de secteurs vétérinaires dont relève cet organisme.

TITRE II DISPOSITIONS COMPLEMENTAIRES RELATIVES AUX ETABLISSEMENTS FABRIQUANT DES PREPARATIONS CULINAIRES ELABOREES A L'AVANCE

Art. 34. - Sont soumises à ces dispositions spécifiques les cuisines fabriquant sur place des préparations culinaires destinées à un restaurant attenant et dont la consommation est différée d'au moins un service et les cuisines livrant des lieux de consommation non attenants, notamment les cuisines centrales livrant en liaison chaude ou froide des restaurants satellites.

Chapitre I^{er} Aménagement et équipement des locaux

Art. 35. - Dans les établissements mentionnés à l'article 1er, fabriquant des préparations culinaires élaborées à l'avance, toute mesure doit être prise pour éviter la contamination des denrées lors des opérations mentionnées dans le présent titre. Ces établissements doivent disposer, sans préjudice des dispositions des articles 6 et 7 du présent arrêté, de locaux ou enceintes spécifiques et séparés nécessaires à leur activité, au besoin réfrigérés, en particulier pour :

- a) L'élaboration des préparations froides;
- b) Les opérations de conditionnement-allotissement lorsque ces opérations sont conjointes;
- c) Les opérations de déconditionnement et de reconditionnement telles que prévues à l'article 41, lorsqu'elles existent;
- d) S'il y a lieu, l'entreposage des préparations culinaires élaborées à l'avance réfrigérées, surgelées ou congelées aux températures requises avant expédition.

Toutefois, l'absence des locaux prévus aux points b et c peut être tolérée, dès lors qu'une analyse spécifique des risques propres à ces opérations a montré que la mise en oeuvre de procédures de travail et de contrôles adaptées permet de pallier ces absences en maîtrisant tous les risques supplémentaires qui y sont associés.

Le circuit d'expédition, de retour et de lavage des contenants devra respecter les règles des bonnes pratiques d'hygiène.

Art. 36. - Les conditionnements et les emballages vides sont entreposés avant leur utilisation dans des conditions hygiéniques permettant d'éviter toute contamination.

Chapitre II Préparation et distribution

Art. 37. - Depuis le dernier stade de leur traitement thermique jusqu'au moment de leur remise au consommateur, les préparations culinaires élaborées à l'avance livrées en liaison chaude sont maintenues à une température supérieure ou égale à +63 °C, ou, si nécessaire pour des raisons organoleptiques, à une température moins élevée, dès lors que l'analyse des risques prévue à l'article 5 a montré qu'une telle température n'entraîne pas de risque pour la santé du consommateur.

Art. 38. - En complément de l'article 23, la température des préparations culinaires élaborées à l'avance congelées ou surgelées ne doit pas excéder celles indiquées en annexe du présent arrêté tout au long de leur stockage jusqu'au moment de leur éventuelle remise en température avant consommation. Pendant leur transport, les préparations culinaires élaborées à l'avance sont soumises à la réglementation en vigueur.

Art. 39. - Après leur utilisation, les récipients réutilisables destinés au transport des préparations culinaires élaborées à l'avance sont nettoyés sans délai, désinfectés par un procédé adéquat puis rincés. Ces opérations sont renouvelées avant remplissage si nécessaire. Ces récipients ne peuvent en aucun cas être utilisés à un usage autre qu'alimentaire.

Art. 40. - La détermination de la durée de vie des préparations culinaires élaborées à l'avance est placée sous l'entière responsabilité du responsable de l'établissement. Cependant, la durée de vie des préparations culinaires élaborées à l'avance réfrigérées ne peut excéder trois jours après celui de la fabrication, en l'absence d'études de vieillissement dûment documentées réalisées par un laboratoire reconnu. Sur l'une des faces externes de chaque conditionnement des préparations culinaires élaborées à l'avance figure au minimum la date limite de consommation.

Chapitre III Cas particulier des opérations de déconditionnement-reconditionnement

Art. 41. - Au vu du risque sanitaire particulier qu'elles impliquent, les opérations de déconditionnement de préparations culinaires élaborées à l'avance réfrigérées ou congelées, suivies de leur reconditionnement en vue de les soumettre, dans l'intervalle, à certains traitements complémentaires potentiellement contaminants, tels que tranchage, portionnement, transvasement, découpage ou assemblage, ne peuvent être admises qu'aux conditions suivantes :

- a) Ces opérations ne peuvent porter que sur des préparations culinaires élaborées à l'avance ou des denrées alimentaires issues d'un établissement titulaire d'un agrément sanitaire ou effectivement dispensé d'agrément pour les denrées animales et d'origine animale;
- b) Toute mesure adaptée doit être prise afin de garantir que la température en tout point des préparations culinaires élaborées à l'avance demeure strictement inférieure à +4 °C avant leur déconditionnement et après leur reconditionnement.

En tout état de cause, dans l'intervalle de temps séparant ces deux opérations, les conditions du ou des traitements appliqués aux préparations culinaires doivent permettre d'éviter toute élévation de température et toute pollution préjudiciable à leur sécurité.

Art. 42. - La durée de vie des produits ainsi déconditionnés, traités puis reconditionnés, et la date limite de consommation qui en découle, ne peut excéder la durée de vie initiale du produit ou du constituant de l'assemblage qui présente la durée de vie la plus courte. En l'absence d'études de vieillissement réalisées par un laboratoire reconnu, la durée de vie des préparations culinaires élaborées à l'avance reconditionnées ne peut excéder trois jours non compris le jour du déconditionnement.

Art. 43. - Toute mesure adaptée doit être prise pour assurer la bonne traçabilité des produits reconditionnés conformément aux dispositions

de l'article 41. En particulier, l'étiquetage du produit fini comporte au minimum :

- a) Sa dénomination ;
- b) Sa DLC ou sa DLUO dans les formes prévues au décret du 7 décembre 1984 susvisé ;
- c) Une information permettant aux agents des services officiels de contrôle de retrouver directement ou indirectement les informations suivantes ;
- d) La DLUO ou la DLC du produit initial ;
- e) La date de déconditionnement et de reconditionnement du produit initial ;
- f) Le cas échéant, la date de mise en décongélation du produit initial.

Toutes ces informations sont enregistrées sur un support papier unique ou sur un support informatique, et reliées sans ambiguïté à l'étiquetage des produits.

TITRE III

DISPOSITIONS COMPLÉMENTAIRES RELATIVES AUX ÉTABLISSEMENTS LIVRANT, DISTRIBUANT OU METTANT SUR LE MARCHÉ LEURS PRODUITS

Art. 44. - Chaque préparation culinaire élaborée à l'avance par une cuisine centrale et destinée à être consommée au sein d'un autre établissement est revêtue sur l'une des faces externes de son conditionnement d'une marque de salubrité reproduisant le numéro d'agrément de l'établissement de fabrication. Cette marque est circulaire et se présente sous la forme suivante :

- dans la partie supérieure, le numéro de codification du département précédé de la lettre F ;
- au centre, le numéro de codification de la commune ou, pour Paris, Lyon et Marseille, de l'arrondissement suivi d'un point et du numéro d'ordre de l'établissement ;
- dans la partie inférieure, les lettres ISV pour inspection sanitaire vétérinaire.

Toutefois, dans le cas des préparations culinaires élaborées à l'avance livrées en liaison chaude, la marque de salubrité de la cuisine centrale peut n'être apposée que sur les documents d'accompagnement, qui sont dès lors obligatoires.

Le modèle de la marque de salubrité figure en annexe II au présent arrêté.

Les dispositions du présent article ne sont pas applicables aux organismes placés sous l'autorité ou la tutelle du ministre de la défense qui obéissent à des règles particulières fixées par voie d'instruction.

Art. 45. - Sans préjudice de la réglementation en vigueur en matière d'étiquetage, l'étiquette de ces préparations culinaires élaborées à l'avance en liaison froide devra impérativement mentionner leur date de fabrication.

Pour les préparations culinaires élaborées à l'avance en liaison chaude, cette date de fabrication ainsi que la dénomination de vente du produit, sa date limite de consommation et les conditions requises pour sa conservation sont portées sur le document d'accompagnement.

Art. 46. - Les opérations visées par l'article 39 sont réalisées sur le lieu de consommation.

TITRE IV DISPOSITIONS FINALES

Art. 47. - Les établissements visés au titre Ier et au titre II sont soumis à la déclaration préalable d'activité visée à l'article 3. Dans le cas des établissements visés par le titre II, cette déclaration préalable est accompagnée d'un dossier complet comprenant notamment :

- la description détaillée à l'aide d'un plan des locaux, notamment ceux affectés à la réception et à l'entreposage des denrées, à l'entreposage des conditionnements et des emballages, à la fabrication, à l'entreposage et à l'expédition des préparations culinaires ;
- la description de l'équipement, du matériel utilisé et des conditions de fonctionnement ;

- la capacité de stockage des denrées alimentaires et des préparations culinaires ainsi que le tonnage de production journalière prévu qui peut être exprimé en nombre de repas ou de rations ;
- une attestation de raccordement au réseau public ou une copie de l'arrêté préfectoral autorisant l'utilisation d'eau d'une autre origine, avec le résultat des analyses effectuées ;
- le plan de nettoyage et de désinfection de l'établissement ;
- le plan de lutte contre les animaux indésirables ;
- le plan de formation du personnel.

Art. 48. - Les établissements visés au titre III ci-dessus et répondant aux prescriptions du présent arrêté sont agréés par le préfet dans les conditions fixées par l'arrêté du 28 juin 1994 relatif à l'identification et à l'agrément sanitaire des établissements mettant sur le marché des denrées animales ou d'origine animale et au marquage de salubrité.

Les dispositions du présent article ne sont pas applicables aux organismes placés sous l'autorité ou la tutelle du ministre de la défense.

Art. 49. - Sans préjudice des sanctions prévues pour les infractions aux prescriptions des textes en vigueur en matière de répression des fraudes, les infractions aux prescriptions des articles 3 à 46 relèvent des peines prévues à l'article 26 du décret du 21 juillet 1971 susvisé et à l'article 20 du décret du 26 avril 1991 susvisé.

Art. 50. - Les établissements dont le permis de construire est postérieur à la publication du présent arrêté doivent répondre à toutes les exigences énoncées ci-dessus.

Il en est de même pour les établissements existants à la date de publication du présent arrêté. Toutefois, un délai d'un an à compter de la publication du présent arrêté leur est accordé pour répondre aux dispositions de l'article 5 et un délai de trois ans pour répondre à celles de l'article 35.

Art. 51. - Le contrôle de l'hygiène des denrées alimentaires dans les organismes placés sous l'autorité du ministre de la défense relève, au titre de l'exercice des compétences en matière vétérinaire qui lui est rattaché et conformément aux dispositions du décret du 14 juillet 1991 susvisé, du service de santé des armées, ainsi que du contrôle général des armées dans le cadre de l'article 5 du décret du 19 juillet 1985 susvisé.

Art. 52. - Sont abrogés :

- les dispositions de l'arrêté du 26 juin 1974 susvisé, pour ce qui concerne les établissements visés au présent arrêté ;
- l'arrêté du 26 septembre 1980 réglementant les conditions d'hygiène applicables dans les établissements de restauration où sont préparés, servis ou distribués des aliments comportant des denrées animales ou d'origine animale.

Art. 53. - Le directeur général de l'alimentation, le directeur général de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, le directeur général de la santé et le directeur central du service de santé des armées sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au Journal officiel de la République française.

Fait à Paris, le 29 septembre 1997.

Le ministre de l'agriculture et de la pêche,

Pour le ministre et par délégation :

Le directeur général de l'alimentation,

M. Guillou Le ministre de la défense,

Pour le ministre et par délégation :

Le directeur du cabinet civil et militaire,

F. Rousselet Le secrétaire d'Etat à la santé,

Pour le secrétaire d'Etat et par délégation :

Le directeur général de la santé, J.-F. Girard, Le secrétaire d'Etat aux petites et moyennes entreprises, au commerce et à l'artisanat,

Pour le secrétaire d'Etat et par délégation :

Le directeur général de la concurrence,

de la consommation et de la répression des fraudes, J. Gallot

LIMITER LA MULTIPLICATION DES GERMES : HYGIÈNE DES PRÉPARATIONS ET DES TRANSPORTS

1. Hygiène des préparations

1.1. Bases théoriques

Rappelons quelques données importantes, pour la plupart déjà abordées dans les précédents chapitres :

- seule une température de -20 °C au cœur d'une denrée bloque les processus vitaux des micro-organismes ;
- seules les températures négatives et celles supérieures à 63 °C au cœur de l'aliment s'opposent à la multiplication des microbes et à la sécrétion des toxines ;
- l'intervalle de température compris entre $+10\text{ °C}$ et $+63\text{ °C}$ est une zone à risque pour les denrées alimentaires, car il correspond à des valeurs pour lesquelles la prolifération microbienne peut être importante.

À toutes les étapes de la chaîne de préparation et de distribution, les plats cuisinés doivent être le moins longtemps possible soumis à des températures comprises dans cette fourchette. C'est pourquoi la préparation, le transport et la distribution des plats cuisinés à l'avance, dans le but d'assurer leur sécurité bactériologique, font appel à l'un des deux processus suivants :

- la **liaison froide** qui propose un refroidissement rapide et le maintien des aliments à des températures, au cœur de l'aliment, au moins inférieures à $+10\text{ °C}$ dans le cas de la liaison réfrigérée et -18 °C pour la liaison surgelée. Ce procédé autorise une consommation différée ;
- la **liaison chaude** qui consiste à maintenir les aliments à une température supérieure à 63 °C dès leur préparation achevée jusqu'au moment de leur consommation qui ne peut être différée.

1.2. Les impératifs techniques de la liaison froide

1.2.1. Refroidissement et stockage

- **Première étape**

Elle consiste en un refroidissement rapide ($+10\text{ °C}$ en liaison réfrigérée et -20 °C en liaison surgelée en moins de deux heures) d'un plat cuisiné dont la température en fin de préparation atteint souvent 80 °C . Ceci implique l'utilisation d'une **cellule de refroidissement rapide**. La source de froid peut être l'azote liquide, le dioxyde de carbone ou un compresseur.

- **Deuxième étape**

Il s'agit, ensuite, de stocker les plats cuisinés à des températures inférieures à $+3\text{ °C}$ en liaison réfrigérée, et -18 °C en liaison surgelée. Ceci implique la possession d'une chambre froide exclusivement consacrée aux plats cuisinés.

1.2.2. Remise en température

- **Au moment de la consommation**

Le plat doit être réchauffé de $+3\text{ °C}$ ou -18 °C à $+63\text{ °C}$ ou plus, en moins d'une heure (tout contact prolongé à des températures moyennes permettrait un développement microbien). Il existe des appareils de « remontée en température » qui répondent parfaitement à cette exigence sans recuire l'aliment ni altérer ses qualités organoleptiques. Ce résultat est habituellement obtenu en trente minutes à partir de $+3\text{ °C}$, une heure en liaison surgelée par des appareils à infrarouges, à air chaud pulsé ou fonctionnant sur le principe des micro-ondes.

- **Une obligation**

Ne réchauffer que les quantités exactes nécessaires pour les repas (les excédents doivent être détruits), ce qui suppose de bonnes prévisions. La liaison froide, malgré les investissements élevés qu'elle nécessite, est très employée car elle présente la plus grande souplesse d'utilisation (surtout la liaison réfrigérée).

1.2.3. Date limite de consommation

L'arrêté du 21 janvier 1993 et celui du 29 septembre 1997 placent la date limite de consommation sous la responsabilité directe du fabricant. De la même façon, la température à laquelle des produits microbiologiquement périssables, comme les plats cuisinés, doivent être entreposés et transportés, est fixée par le fabricant. La date de fabrication doit être inscrite sur l'étiquetage des plats.

Nature de la denrée	Température maximale de conservation
Denrées à l'état congelé	
- Toute denrée surgelée, glaces et crèmes glacées	-18 °C
- Autres denrées congelées	-12 °C
Denrées réfrigérées	
Tableau 1 – Températures maximales de conservation des denrées alimentaires	
- Poissons, mollusques et crustacés conditionnés (à l'exception des poissons, mollusques et crustacés vivants)	0 à +2 °C, soit la température de la glace fondante
- Viandes hachées et préparations de viandes hachées	+2 °C
- Abats et préparations de viandes contenant des abats	+3 °C
- Autres préparations de viandes de toutes espèces, y compris la chair à saucisse et la saucisse crue - Viandes de volailles, lapin, rongeurs, gibier d'élevage, gibier à plumes - Ovoproduits à l'exception des produits UHT	+4 °C
- Œufs réfrigérés	+5 °C
- Lait cru	+4 °C
- Viandes d'animaux de boucherie, viandes de gibier ongulé	+7 °C
- Lait pasteurisé	+6 °C
- Produits laitiers frais (yaourts, kéfirs, crème et fromages frais). - Divers produits transformés à base de viande, plats cuisinés et préparations culinaires (viande, poisson), produits à base de poisson, à l'exception des produits ayant subi un traitement complet par salaison, fumage, séchage ou stérilisation - Divers produits à base de lait tels crèmes pâtisseries, pâtisseries fraîches, entre-mets, fromages affinés. - Autres denrées	température définie sous la responsabilité du fabricant ou du conditionneur

Tableau 1 – Températures maximales de conservation des denrées alimentaires

1.3. Les impératifs techniques de la liaison chaude (fig. 1, page ci-contre)

Maintenir des plats cuisinés à 63 °C depuis le fourneau jusqu'à l'assiette n'est pas chose très aisée.

En effet, le séjour en contenants isothermes, quelle que soit la qualité de l'isolation, s'accompagne généralement d'une perte de 2 °C à 4 °C par heure. Partir de températures supérieures présente le risque d'une cuisson supplémentaire qui peut s'avérer néfaste pour les qualités gustatives de la préparation.

Il convient donc d'éliminer toute cause de refroidissement de l'aliment :

- en le conditionnant dans des récipients préchauffés ;
- en n'ouvrant le contenant qu'au dernier moment, ou à défaut en utilisant une armoire chauffante dans l'attente de la distribution.

2. Quelques pratiques culinaires en rapport avec l'hygiène

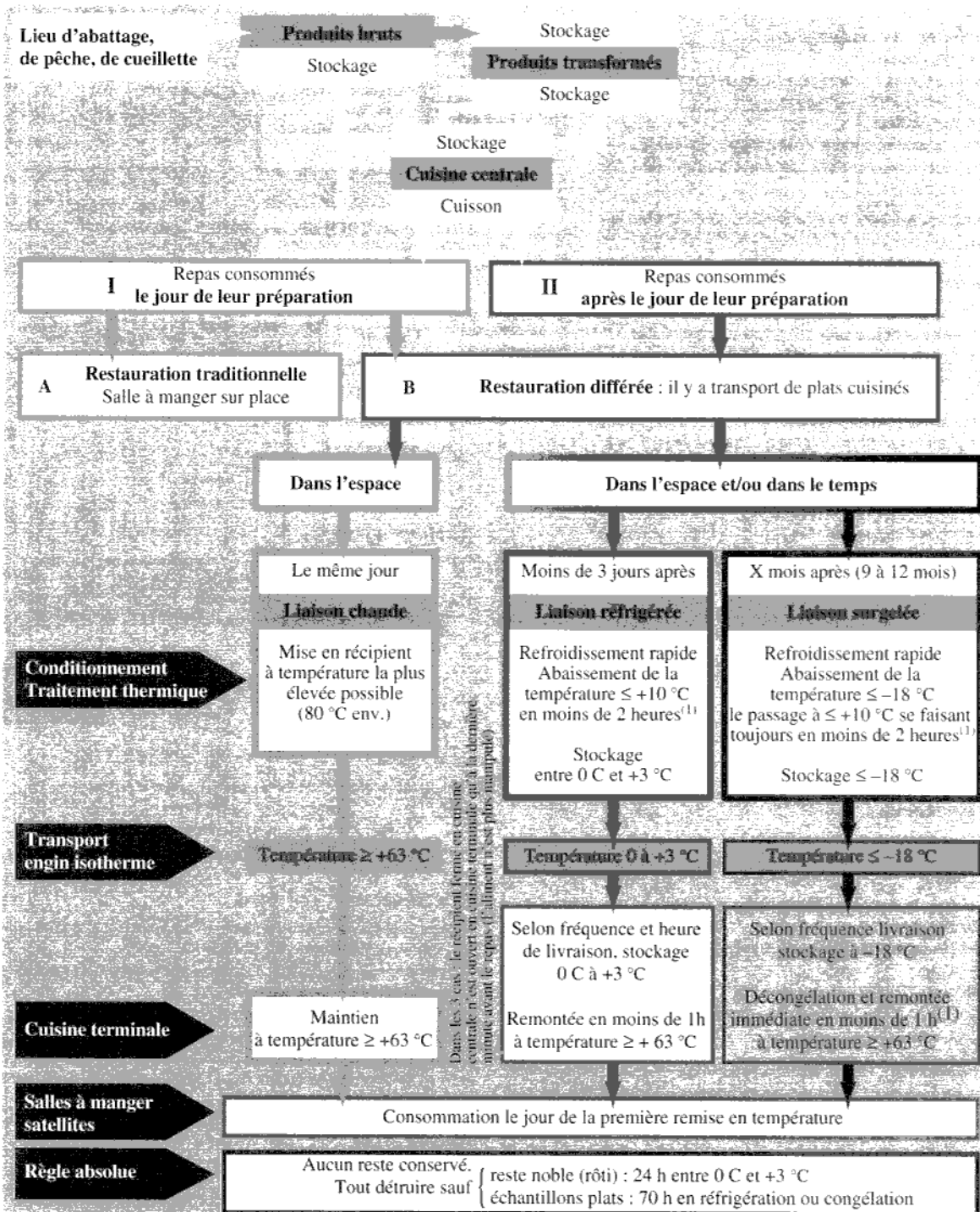
Les légumes peuvent être souillés avec de la terre, leur préparation ne doit pas être à l'origine de la contamination des autres denrées. L'épluchage est donc pratiqué dans un local ou un emplacement séparé qui est lavé et désinfecté après chaque séance. Au cours du lavage des légumes, il faut éviter de les maintenir trop longtemps en position de trempage ; cette pratique favoriserait la prolifération des micro-organismes, surtout en eau tiède. Il convient aussi de les diviser avec un matériel en parfait état de propreté et peu de temps avant la cuisson.

L'habillage des poissons, source de projections septiques, est effectué dans un emplacement à part. Les déchets sont évacués sans délai, le poisson est lavé à l'eau froide et entreposé dans la glace fondante.

Celui des volailles présente le risque de dissémination de bactéries contenues dans les viscères (notamment des *Campylobacter*). Il convient donc de suivre une progression rationnelle des opérations sur le principe de la marche en avant, avec, dans un premier temps, la séparation de tous les déchets sans contact avec la planche de travail. Cœur, foie et gésier sont ensuite séparés et éliminés avec les autres déchets. En fin d'opération, le nettoyage et la désinfection de la planche et du matériel sont, bien sûr, de rigueur.

« Les préparations à base d'œufs sans cuisson (mayonnaises, mousses...) doivent être fabriquées le plus près possible du moment de la consommation. Dans cette attente, elles doivent être maintenues au froid ainsi que les plats dans lesquels elles pourraient être incorporées. Tous les restes doivent être éliminés et les préparations la veille du service sont absolument proscrites.

Les salmonelles étant très sensibles à l'action de la chaleur, la cuisson permet d'assainir les préparations culinaires. Il convient que les préparations qui supportent mal l'ébullition (crèmes, sauces...) soient maintenues à une température d'au moins 70 °C, ce que tout cuisinier peut aisément vérifier ». (Note de service du 30 janvier 1989).



(1) Sauf si l'analyse des risques montre que des conditions différentes sont compatibles avec la sécurité de la préparation.

Fig. 1 – Liaison chaude, liaison froide

(d'après La restauration sociale et commerciale, publication du ministère de l'Agriculture et en application de l'arrêté du 29 septembre 1997)

• Les denrées

Choix des produits

Les approvisionnements de viandes, lait cru, charcuteries, volailles, doivent être faits dans des établissements agréés par les services vétérinaires du département.

Stockage des produits

Les produits alimentaires doivent être stockés dans les conditions figurant dans le tableau 1.

Les appareils de conservation

– Le congélateur

Il s'utilise pour les produits déjà congelés et non pour des produits destinés à être congelés.

– Le réfrigérateur

Éviter d'y introduire cartons et emballages divers...

Les denrées doivent reposer sur des clayettes, dans des boîtes en plastique.

Séparer les produits d'entretien des produits alimentaires.

• Les locaux

Séparer les postes de travail : le secteur des préparations froides sera distinct de celui des préparations chaudes.

Secteur propre et secteur souillé ne doivent pas se croiser : prévoir une entrée pour les produits/une sortie pour les déchets.

Les déchets doivent être évacués au fur et à mesure dans des sacs étanches vers un local (poubelles) séparé de la cuisine, hors d'atteinte des animaux.

• Maintenance des matériels

Murs et carrelages en bon état.

Lavages quotidiens des sols, ustensiles et plans de travail.

Produits d'entretien : respecter leur fonction propre (produits réservés aux sols/produits réservés à la vaisselle).

Animaux familiers (chiens et chats) ne doivent pas errer dans les cuisines.

Éviter fleurs et plantes vertes.

Travailler à même le plan de travail (éviter toiles cirées, nappes de protection, etc.).

Pour éviter toute présence de parasites, prévoir une dératisation et désinsectisation annuelles.

• Le personnel

Veiller à la bonne santé du personnel.

Surveiller l'apparition de toutes affections respiratoires, intestinales ou cutanées.

Prévoir pour le personnel de cuisine des locaux sanitaires distincts de ceux des enfants.

Équiper les locaux sanitaires de lavabos avec commandes d'eau à pédales.

Utiliser savons liquides et essuie-mains jetables.

Mettre à disposition des tenues de travail propres pour en changer chaque jour au minimum.

Pour tous travaux dans les cuisines, nous conseillons aux responsables locaux de s'adresser aux services vétérinaires, soit directement, soit par l'intermédiaire des vétérinaires vacataires chargés de l'hygiène alimentaire.

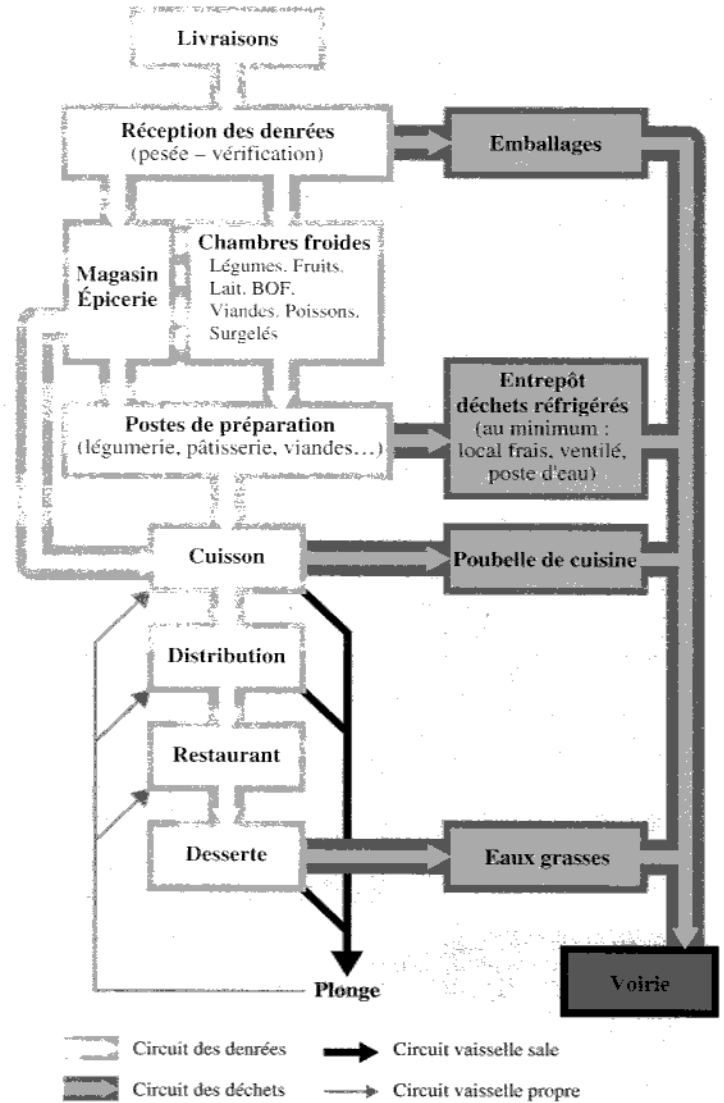


Fig. 2 – Le procédé de la marche en avant (Document du ministère de l'Agriculture)

• La préparation des repas

Ne pas effectuer de décongélation en air ambiant : la décongélation doit s'effectuer dans un réfrigérateur.

Maintenir les aliments, après cuisson, à une température de $+63^{\circ}\text{C}$ et cela jusqu'à leur service.

Ne jamais laisser refroidir les plats.

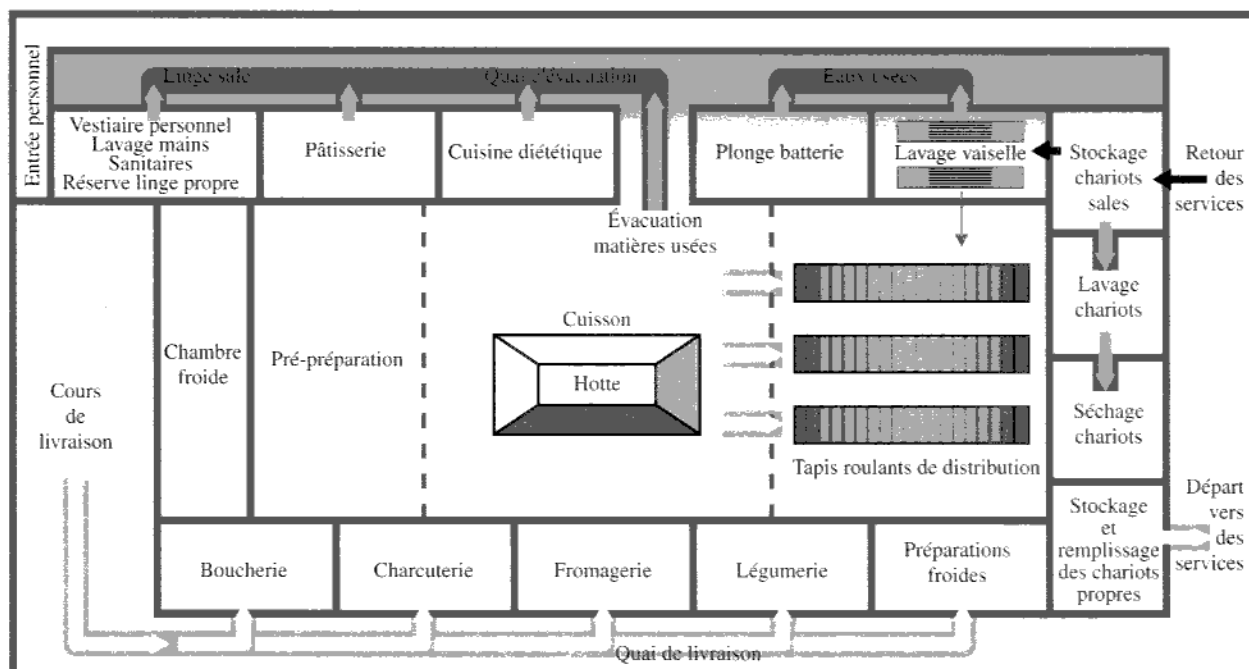
Maintenance de cette température, $+63^{\circ}\text{C}$, si les plats chauds sont amenés à être transportés d'un lieu à un autre.

Entrées, pâtisseries, fromages doivent être maintenus, après confection, dans une armoire réfrigérée.

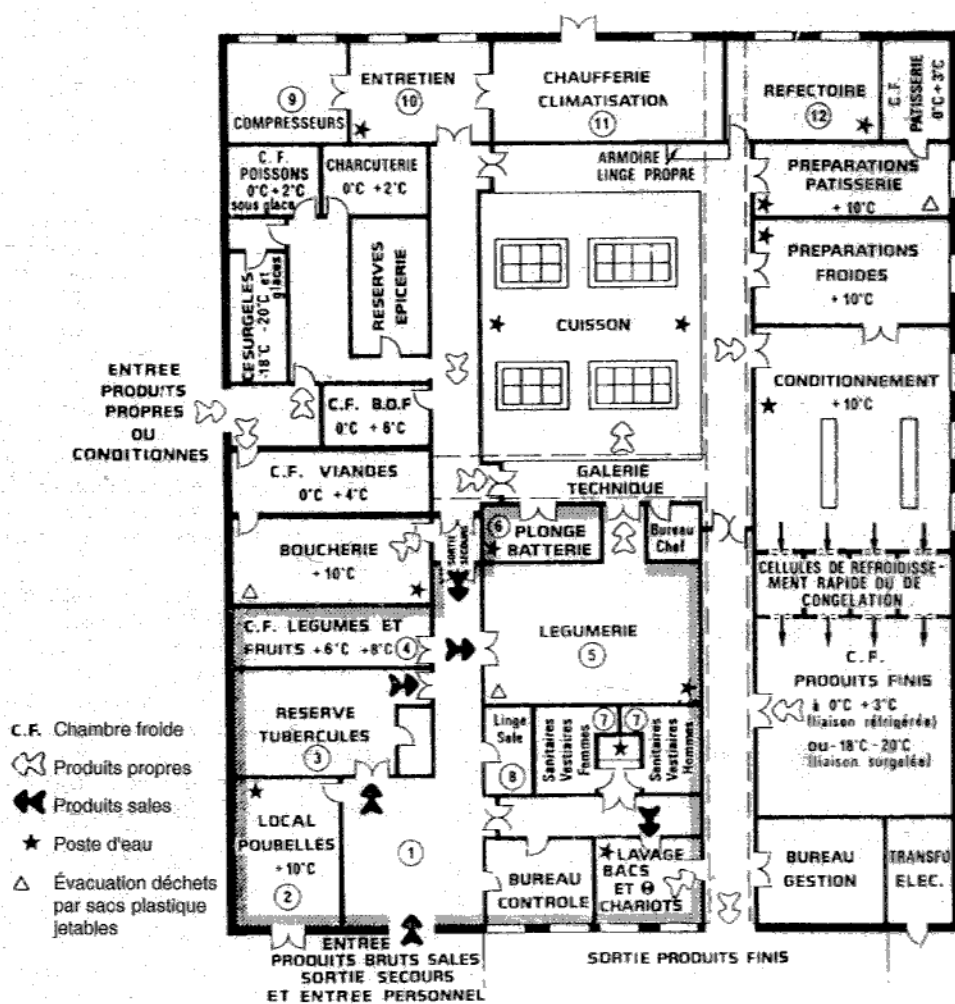
Il ne doit pas s'écouler plus d'une heure entre la préparation et le service d'un plat.

Pour éviter tout accident, ne pas utiliser les restes.

Document 1 – Pratiques conseillées en restauration collective (d'après une documentation des services vétérinaires)



Document 2 – Plan schématique d'une cuisine centrale hospitalière



Document 3 – Organisation d'une cuisine centrale distribuant 5 000 repas par jour en liaison froide (Document EDF)

MINISTÈRE DE L'ÉCONOMIE

Arrêté du 9 mai 1995 réglementant l'hygiène des aliments remis directement au consommateur

NOR: ECOC9500071A

Le ministre d'État, ministre des affaires sociales, de la santé et de la ville, le ministre de l'économie et le ministre de l'agriculture et de la pêche,

Vu la directive 93/43/CEE du Conseil du 14 juin 1993 relative à l'hygiène des denrées alimentaires;

Vu le décret n° 55-241 du 10 février 1955 portant application de la loi du 1er août 1905 susvisée concernant le commerce des conserves et semi-conserves alimentaires, et notamment ses articles 3 et 4;

Vu le décret n° 64-949 du 9 septembre 1964 portant application de la loi du 1er août 1905 sur les fraudes et falsifications en matière de produits ou de services en ce qui concerne les aliments surgelés destinés à l'alimentation humaine;

Vu le décret n° 71-636 du 21 juillet 1971 pris pour l'application des articles 258, 259 et 262 du code rural et relatif à l'inspection sanitaire et qualitative des animaux vivants et des denrées animales ou d'origine animale, et notamment ses articles 3, 5, 7, 8, 25 et 26;

Vu le décret n° 73-138 du 12 février 1973 portant application de la loi du 1er août 1905 sur les fraudes et falsifications en ce qui concerne les procédés et les produits utilisés pour le nettoyage des matériaux et objets destinés à entrer en contact avec les denrées, produits et boissons pour l'alimentation de l'homme et des animaux;

Vu le décret n° 84-1147 du 7 décembre 1984 portant application de la loi du 1er août 1905 sur les fraudes et falsifications en matière de produits ou de services en ce qui concerne l'étiquetage et la présentation des denrées alimentaires, notamment ses articles 5 et 17;

Vu le décret n° 89-3 du 3 janvier 1989 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux minérales naturelles;

Vu le décret n° 91-409 du 26 avril 1991 fixant les prescriptions en matière d'hygiène concernant les denrées, produits ou boissons destinés à l'alimentation humaine, à l'exclusion de ceux mentionnés aux articles 258, 259 et 262 du code rural, des eaux destinées à la consommation humaine et des eaux minérales naturelles, et notamment ses articles 2, 3, 4, 5, 10, 15, 19 et 20;

Vu le décret n° 92-631 du 8 juillet 1992 relatif aux matériaux et objets destinés à entrer en contact avec les denrées, produits et boissons pour l'alimentation de l'homme ou des animaux;

Vu l'arrêté du 26 juin 1974 relatif à la réglementation des conditions hygiéniques de congélation, de conservation et de décongélation des denrées animales ou d'origine animale;

Vu l'arrêté du 28 septembre 1989 relatif aux viandes hachées, préparations de viandes et de morceaux de moins de cent grammes;

Vu l'arrêté du 22 mars 1993 relatif aux règles d'hygiène applicables aux produits végétaux ou d'origine végétale destinés à la consommation humaine et qui sont soumis à un traitement thermique leur conférant la stabilité biologique à température ambiante d'entreposage;

Vu l'avis du Conseil supérieur d'hygiène publique de France,

Arrêtent:

TITRE I^{er}

CHAMP D'APPLICATION

Art. 1^{er}. - Les dispositions du présent arrêté s'appliquent à tous les établissements où les aliments sont soit préparés en vue de leur remise directe au consommateur, soit remis directement au consommateur.

Par remise directe, on entend toute opération, à titre gratuit ou onéreux, réalisée entre un détenteur d'un aliment et un particulier destinant ce produit à sa consommation.

Sont notamment visées:

- les activités des établissements de distribution alimentaire qui assurent la remise directe d'aliments provenant d'un autre établissement ou de leur propre production, y compris les producteurs fermiers commercialisant leur production à la ferme ou sur un

marché de proximité à l'exclusion de l'abattage des volailles à la ferme visé par le décret no 66-239 du 18 avril 1966;

- les activités des établissements de restauration, y compris les fermes-auberges, sans préjudice des dispositions réglementaires plus spécifiques prévues pour la restauration à caractère social;
- les activités non sédentaires ou occasionnelles, en particulier celles s'exerçant sur les marchés de plein air équipés ou non, les voitures boutiques, les activités utilisant des structures légères.

TITRE II

DISPOSITIONS GÉNÉRALES

Art. 2. - Les prescriptions de l'ensemble des chapitres du présent titre s'appliquent à tous les établissements dans lesquels s'exercent les activités mentionnées à l'article 1^{er}, à l'exclusion de ceux utilisés pour des activités non sédentaires ou occasionnelles de distribution ou de restauration. Pour ces derniers établissements, qui sont couverts par le chapitre III du titre III, seules sont applicables les dispositions des chapitres IV à VII du présent titre.

CHAPITRE I^{er}

Locaux

Art. 3. - 1. Les locaux mentionnés au présent titre doivent être propres et en bon état d'entretien. Ils ne doivent pas entraîner, par les activités qui s'y exercent, un risque de contamination des aliments.

2. Par leur conception, leurs dimensions, leur construction et leur agencement, ces locaux doivent permettre la mise en œuvre de bonnes pratiques d'hygiène, et notamment:

a) Prévenir la contamination croisée, entre et durant les opérations, par les denrées alimentaires, les équipements, les matériaux, l'eau, l'aération, le personnel et les sources de contamination extérieures tels les insectes et autres animaux;

b) Pouvoir être nettoyés et/ou désinfectés de manière efficace;

c) Permettre de prévenir le contact avec des substances toxiques, le déversement de matières contaminantes dans les denrées alimentaires, y compris du fait des plafonds, faux plafonds et autres équipements situés en hauteur;

d) Offrir, le cas échéant, des conditions de température permettant d'effectuer de manière hygiénique les opérations visées par le présent arrêté;

e) Être aérés et ventilés afin de permettre une hygrométrie assurant la maîtrise des phénomènes de condensation ou d'éviter la persistance des mauvaises odeurs. Le cas échéant, les systèmes de ventilation ou de climatisation ne doivent pas être une source de contamination des aliments et être conçus de manière à permettre d'accéder aisément aux filtres et aux autres pièces devant être nettoyées ou remplacées;

f) Être convenablement éclairés;

g) Être pourvus de moyens d'évacuation des eaux résiduaires et des eaux de lavage conçus de manière à éviter tout risque de contamination des denrées alimentaires et permettre une évacuation rapide;

h) De plus, les aires de stockage des déchets doivent être conçues et gérées de manière à être propres en permanence et à prévenir la contamination des denrées alimentaires, de l'eau potable, des équipements et des locaux.

3. Dans ces locaux, des méthodes adéquates doivent être utilisées pour lutter contre les insectes et les ravageurs.

Art. 4. - Afin d'assurer l'hygiène corporelle et vestimentaire du personnel, ces mêmes locaux doivent comporter:

a) Des vestiaires ou des penderies en nombre suffisant permettant de revêtir des vêtements de protection propres et adaptés à son activité avant l'entrée dans les locaux où sont manipulés ou manutentionnés les aliments;

b) Un nombre suffisant de lave-mains et de cabinets d'aisances équipés d'une cuvette et d'une chasse d'eau et raccordés à un système d'évacuation efficace. Ces cabinets d'aisances ne doivent pas

communiquer directement avec des locaux utilisés pour la préparation et la détention des denrées alimentaires.

Les lave-mains sont alimentés en eau courante chaude et froide et sont équipés de dispositifs adéquats pour le lavage et le séchage hygiéniques des mains. Ils doivent être distincts des dispositifs de lavage des denrées alimentaires.

Ces équipements doivent être maintenus en permanence en état de propreté.

Ces locaux doivent être équipés d'une ventilation adéquate.

CHAPITRE II Équipements

Art. 5. - 1. Sans préjudice des dispositions du décret du 12 février 1973 susvisé, tous les matériels et équipements avec lesquels les denrées alimentaires entrent en contact, notamment les comptoirs de vente, les gondoles, les tables et les ustensiles, doivent être maintenus en permanence propres et :

a) Construits et entretenus de manière à éviter les risques de contamination des denrées alimentaires ;

b) Construits et entretenus de manière à permettre un nettoyage efficace et, lorsque cela s'avère nécessaire pour éviter la contamination des aliments, une désinfection adéquate, à l'exception des conteneurs et emballages perdus ;

c) Installés de manière à permettre le nettoyage de la zone environnante.

2. Des installations et/ou dispositifs adéquats doivent être prévus pour maintenir les denrées alimentaires dans les conditions de température mentionnées à l'article 10 ci-dessous et pour contrôler celles-ci.

En particulier, les locaux d'entreposage d'aliments surgelés et congelés ainsi que de glaces, crèmes glacées et sorbets d'une capacité comprise entre dix et cent mètres cubes doivent être équipés d'instruments appropriés d'enregistrement automatique de la température destinés à mesurer fréquemment et à intervalle régulier la température de l'air à laquelle sont soumis ces produits. Dans le cas de chambres froides de moins de dix mètres cubes destinées à la conservation de stocks dans les magasins de détail, cette mesure peut être réalisée au moyen d'un thermomètre aisément visible.

Les meubles de vente au détail d'aliments surgelés, congelés et de glaces, crèmes glacées et sorbets doivent être équipés d'un thermomètre ou d'un enregistreur de température pour la mesure de la température de l'air ; l'indication de la température doit être visible par le consommateur. Dans le cas des meubles ouverts, un thermomètre indique la température au retour d'air ; le capteur du thermomètre doit être accessible sans démontage afin de vérifier le fonctionnement de l'appareil et être placé au retour d'air, immédiatement au-delà des zones vitrées, si elles existent, et au plus près de la ligne de charge maximale, qui doit être nettement indiquée.

Les dispositions de l'alinéa précédent sont applicables aux meubles de vente en place à la date de publication du présent arrêté au Journal officiel de la République française dans un délai maximum d'un an à compter de cette publication.

CHAPITRE III Alimentation en eau

Art. 6. - Sans préjudice des dispositions du décret du 3 janvier 1989 susvisé :

1. L'alimentation en eau destinée à la consommation humaine doit être suffisante, en particulier pour son utilisation dans le cadre de la prévention de la contamination des denrées alimentaires.

2. Lorsque la glace est nécessaire, elle doit être fabriquée, manipulée et stockée dans des conditions prévenant toute contamination.

3. L'eau non potable, utilisée pour la production de vapeur, la réfrigération, la lutte contre l'incendie et à d'autres fins semblables sans rapport avec les denrées alimentaires, doit circuler dans des conduites séparées, facilement identifiables et sans raccordement avec les systèmes d'eau destinés à la consommation humaine ou possibilité de reflux dans ces systèmes.

CHAPITRE IV Personnel

Art. 7. - Sans préjudice des dispositions relatives au personnel prescrites par les décrets du 21 juillet 1971 et du 26 avril 1991 susvisés, les responsables des établissements des secteurs mentionnés à l'article 1er ou leur délégataire doivent s'assurer que les personnes qui manipulent ou manutentionnent les aliments suivent des instructions précises leur permettant d'appliquer les dispositions du présent arrêté et disposent le cas échéant, selon leur activité, d'une formation renouvelée en matière d'hygiène des aliments.

CHAPITRE V Denrées alimentaires

Art. 8. - 1. Toutes les matières premières, les ingrédients, les produits intermédiaires et les produits finis doivent être manipulés, stockés, emballés, exposés et remis au consommateur dans des conditions évitant toute détérioration et toute contamination susceptibles de les rendre impropres à la consommation humaine ou dangereux pour la santé. En particulier, sont interdits dans les locaux où s'exercent ces activités l'entreposage des denrées à même le sol et la présence d'animaux familiers.

2. Toutes précautions sont prises pour que les aliments présentés non protégés soient à l'abri des pollutions pouvant résulter de la proximité du consommateur ou des manipulations de sa part.

Art. 9. - Lorsque sont effectuées, dans une même structure, des opérations telles que l'épluchage, le tranchage, le parage des matières premières et, le cas échéant, leur nettoyage, elles doivent s'effectuer de manière à éviter toute contamination croisée avec des aliments présentant un niveau d'hygiène différent.

En particulier, dans les établissements préparant sur le lieu de vente ou de consommation des aliments, les opérations mentionnées ci-dessus et celles de préparation des aliments peuvent être réalisées en un même emplacement sous réserve d'être échelonnées dans le temps et séparées par des opérations de nettoyage et de désinfection des plans de travail.

Art. 10. - 1. Les matières premières, les ingrédients, les produits intermédiaires et les produits finis jusqu'à leur présentation aux consommateurs doivent être conservés à des températures limitant leur altération et plus particulièrement le développement de micro-organismes pathogènes ou la formation de toxines à des niveaux susceptibles d'entraîner un risque pour la santé.

Pour certains de ces produits, et à l'exclusion des denrées pour lesquelles la température de conservation est définie par des réglementations spécifiques, cette température est fixée en annexe du présent arrêté.

2. Toutefois, et pour autant que la sécurité alimentaire soit assurée, il est admis de soustraire les produits à ces températures ou, le cas échéant, à la température inscrite sur leur emballage sous la responsabilité du conditionneur, conformément aux dispositions du décret du 7 décembre 1984 susvisé :

a) Pour les produits réfrigérés :

i) Lorsque cela s'avère nécessaire, pour de courtes périodes, lors du chargement-déchargement de ces produits aux interfaces entre l'élaboration, le transport, le stockage et l'exposition des aliments et lors de leur présentation à la vente pour permettre le dégivrage des équipements ;

ii) Lors de l'exposition de ces produits en quantités limitées pour une remise immédiate aux consommateurs, sous réserve que les conditions de cette exposition satisfassent à celles prévues dans un guide de bonnes pratiques hygiéniques validé propre au secteur concerné ; À titre transitoire pour une durée de cinq ans à compter de la publication du présent arrêté au Journal officiel, les dispositions ci-dessus ne s'appliquent pas à l'exposition des produits concernés en vue de leur vente sur les marchés de plein air existant à la date de publication de cet arrêté.

b) Pour les aliments congelés et surgelés ainsi que pour les glaces, crèmes glacées et sorbets :

i) Dans la mesure où la différence de température n'excède pas 3 °C, lorsque cela s'avère nécessaire, pour de brèves périodes, lors du chargement-déchargement de ces produits aux interfaces entre

l'élaboration, le transport, le stockage et l'exposition des aliments et lors de leur présentation à la vente ;

ii) Lors de l'exposition des glaces et crèmes glacées pour leur consommation immédiate dans la mesure où leur approvisionnement s'effectue en quantités adaptées aux besoins du service.

Le détenteur des aliments qui ne sont pas conservés dans les conditions fixées à l'alinéa 1er du présent article doit faire procéder à leur retrait de la consommation humaine en l'état.

Art. 11. - Lorsque les denrées alimentaires doivent être conservées ou servies à basse température, elles doivent être réfrigérées aussitôt après le dernier stade du traitement thermique ou, en l'absence de traitement thermique, après le dernier stade de l'élaboration. Les produits sont ensuite immédiatement maintenus aux températures de réfrigération mentionnées à l'article 10 ci-dessus.

Le réchauffement des denrées réfrigérées en vue de leur consommation doit s'effectuer rapidement en vue d'assurer la sécurité alimentaire.

Art. 12. - La décongélation des aliments congelés doit être effectuée à l'abri des contaminations :

A l'occasion de la cuisson ou du réchauffage du produit prêt à consommer ;

Dans une enceinte réfrigérée à une température comprise entre 0 °C et + 4 °C ou par toute autre méthode conforme aux dispositions de l'arrêté du 26 juin 1974 susvisé ayant fait l'objet d'un avis publié au Journal officiel de la République française.

Une fois décongelés, les aliments doivent être présentés réfrigérés durant une période limitée de manière à satisfaire aux dispositions du 1er alinéa de l'article 10 du présent arrêté. Les aliments décongelés ne peuvent être recongelés.

Les aliments ne satisfaisant pas aux dispositions du présent article ne sont pas reconnus propres à la consommation humaine en l'état.

Art. 13. - Sans préjudice des dispositions de l'arrêté du 22 mars 1993 susvisé, les conserves appertisées de denrées alimentaires dont le pH est supérieur ou égal à 4,5 doivent être soumises au traitement décrit au 2^e de l'article 2 du décret du 10 février 1955 susvisé dans des autoclaves ou stérilisateur :

- munis d'un thermomètre à mercure à lecture directe étalonné ou d'un autre système fiable et étalonné régulièrement pour le contrôle de la température, ainsi que d'un dispositif assurant un enregistrement de la température en fonction du temps ;
- employés dans des conditions permettant de satisfaire à leur stabilité.

Les produits appertisés n'ayant pas satisfait aux dispositions du présent article ne sont pas reconnus propres à la consommation.

Art. 14. - Le déconditionnement des produits destinés au tranchage ou au service doit s'effectuer au fur et à mesure des besoins et dans des conditions d'hygiène évitant leur contamination. Les informations concernant l'identification du produit et sa durée de vie doivent être conservées durant toute la détention de celui-ci.

Toutes précautions d'hygiène doivent être prises lors du tranchage des denrées. Les produits tranchés sur place doivent être présentés en quantités aussi réduites que possible au fur et à mesure des besoins du service.

Les denrées microbiologiquement très périssables déconditionnées doivent être protégées de toute contamination lors de leur stockage et de leur mise en vente.

Art. 15. - Les substances et préparations dangereuses et les produits non destinés à l'alimentation humaine doivent être stockés et, le cas échéant, présentés à la vente sur des emplacements particuliers qui font l'objet d'une identification.

CHAPITRE VI Déchets

Art. 16. - En dehors des sous-produits du traitement primaire des denrées alimentaires, notamment les os et les produits de parage des viandes, qui doivent être traités comme des denrées alimentaires

à part entière s'ils sont susceptibles d'une utilisation alimentaire ultérieure à leur obtention sur leur lieu de production, les déchets alimentaires non susceptibles d'une récupération et les autres déchets non alimentaires :

a) Sauf dans le cas visé à l'article 24 ci-dessous, ne doivent pas être stockés dans une zone où sont entreposées des denrées alimentaires. Des dispositions appropriées doivent être prises pour l'élimination et le stockage de ces déchets et autres matières.

b) Doivent être déposés dans des conteneurs étanches, dotés d'une fermeture, ou tout autre moyen satisfaisant au regard de l'hygiène. Ceux-ci doivent être conçus de manière adéquate, régulièrement entretenus, et faciles à nettoyer et à désinfecter. En aucun cas, les déchets produits au cours des opérations sur les aliments ne doivent être jetés à même le sol.

Des dispositions et/ou installations adéquates doivent être prévues pour stocker et éliminer, dans des conditions d'hygiène, les substances et déchets, alimentaires ou non, dangereux, qu'ils soient solides ou liquides.

CHAPITRE VII Contrôles et vérifications

Art. 17. - Les responsables des établissements mentionnés à l'article 1er doivent procéder, chacun en ce qui le concerne, à des contrôles réguliers pour vérifier la conformité des aliments aux dispositions du présent arrêté et, lorsqu'ils existent, aux critères microbiologiques réglementaires auxquels ils doivent satisfaire.

Ces contrôles doivent notamment s'assurer de l'état des produits à réception et porter sur les conditions de conservation, ainsi que sur les méthodes de nettoyage et de désinfection.

Pour établir la nature et la périodicité de ces contrôles, ils doivent identifier tout aspect de leurs activités qui est déterminant pour la sécurité des produits mentionnés à l'article 1er et veiller à ce que des procédures de sécurité appropriées soient établies, mises en œuvre, respectées et mises à jour en se fondant sur les principes utilisés pour développer le système d'analyse des risques et des points critiques pour leur maîtrise, dit système « HACCP », en particulier :

- analyser et évaluer les risques alimentaires potentiels aux différentes étapes du processus de mise en vente et, s'il y a lieu, d'élaboration ;
- mettre en évidence les points des étapes où des risques alimentaires peuvent se présenter ;
- identifier parmi les points qui ont été mis en évidence ceux qui sont déterminants pour la sécurité alimentaire, appelés « points critiques » ;
- définir et mettre en œuvre des moyens de maîtriser ces points et des procédures de suivi efficaces ;
- revoir périodiquement, et notamment en cas de modification des opérations, les procédures établies ci-dessus.

Les responsables de ces établissements doivent être en mesure de porter à la connaissance des agents des administrations chargées des contrôles la nature, la périodicité et le résultat des vérifications définies selon les principes mentionnés à l'alinéa précédent ainsi que, s'il y a lieu, le nom du laboratoire de contrôle.

TITRE III DISPOSITIONS SPÉCIFIQUES

CHAPITRE I^{er}

Locaux de préparation des aliments et leurs équipements

Art. 18. - Les dispositions du présent chapitre sont applicables aux locaux dans lesquels sont préparés des aliments, à l'exclusion des installations utilisées pour des activités de distribution ou de restauration non sédentaires ou occasionnelles qui sont couvertes par le chapitre III du présent titre et des salles à manger dans les établissements de restauration.

Art. 19. - Sans préjudice des dispositions générales du titre II du présent arrêté, dans les locaux mentionnés à l'article 18 ci-dessus :

a) Les surfaces telles que les revêtements de sol, les surfaces murales et les portes doivent être construites ou revêtues avec des matériaux dont les caractéristiques physiques, en particulier d'étan-

chéité et d'absence d'absorption, permettent, notamment en facilitant leur nettoyage, leur lavage et leur désinfection, de limiter les risques de contamination des aliments.

b) Les fenêtres et autres ouvertures doivent être conçues et entretenues de manière à ne pas constituer une source d'insalubrité pour les aliments. Celles ouvrant sur l'extérieur doivent, si nécessaire, être équipées d'écrans de protection contre les insectes. Ces écrans doivent pouvoir être facilement enlevés pour le nettoyage.

Art. 20. - Dans ces locaux, des dispositifs adéquats pour le nettoyage et la désinfection des outils et équipements de travail doivent être prévus. Ces dispositifs doivent être fabriqués dans des matériaux résistants à la corrosion, être faciles à nettoyer et disposer d'une alimentation adéquate en eau potable chaude et froide.

Le nettoyage des matières premières est assuré, le cas échéant, au moyen d'un évier ou d'un dispositif semblable de lavage, alimenté en eau potable froide ou chaude selon les besoins et nettoyé régulièrement.

CHAPITRE II

Établissements de restauration

Art. 21. - Dans les établissements de restauration mentionnés à l'article 1er, doivent être prévues des toilettes comprenant des cabinets d'aisances et des lavabos à l'usage exclusif de la clientèle.

Les cabinets d'aisances ne doivent pas communiquer directement avec la salle à manger ni avec les autres locaux renfermant des aliments.

Toutefois, dans les établissements offrant moins de 50 places, les équipements sanitaires mentionnés à l'article 4 (b) ci-dessus peuvent également servir à la clientèle. Ces équipements doivent être situés de telle manière que la clientèle ne puisse pas pénétrer dans les locaux de préparation des aliments.

Art. 22. - Dans les salles de restaurant et locaux assimilés :

La présence des animaux domestiques ou de plantes ne doit pas constituer un risque d'insalubrité pour les aliments. Le cas échéant, la nourriture destinée aux animaux ne peut être servie dans ces locaux que dans des récipients réservés à cet usage.

Les tables sont tenues constamment en parfait état de propreté et des ustensiles et du linge propres sont mis à la disposition de chaque client.

CHAPITRE III

Activités de distribution ou de restauration, non sédentaires ou occasionnelles

Art. 23. - Pour toutes les activités de distribution ou de restauration, non sédentaires ou occasionnelles :

1. Les installations sont conçues, construites, nettoyées et entretenues de manière à éviter la contamination des denrées alimentaires, y compris, dans la mesure du possible, du fait de la présence d'insectes et d'autres animaux.

2. Plus particulièrement :

a) À défaut d'installations permanentes répondant aux dispositions du paragraphe b de l'article 4 ci-dessus, des dispositifs doivent être prévus pour permettre aux personnes manipulant les aliments de se nettoyer les mains de manière hygiénique ;

b) Les surfaces en contact avec les aliments, y compris les comptoirs de vente, les étals et les tables, doivent être bien entretenues, faciles à nettoyer et, lorsque cela s'avère nécessaire pour éviter la contamination des aliments, à désinfecter. Elles doivent être maintenues en état permanent de propreté. Sans préjudice des dispositions du décret du 8 juillet 1992 susvisé, elles doivent être conçues en matériaux lisses, sauf si les exploitants peuvent prouver aux agents des administrations chargées des contrôles que d'autres matériaux utilisés conviennent ;

c) Des moyens adéquats doivent être prévus :

- pour le nettoyage et, lorsque cela s'avère nécessaire pour prévenir la contamination des aliments, la désinfection des outils et équipements de travail ;
- pour protéger les denrées alimentaires des contaminations éventuelles ;
- pour assurer le respect des conditions de température requises à l'article 10 ci-dessus ;

d) De l'eau potable, froide ou chaude, doit être prévue en quantité suffisante, notamment pour réaliser les opérations visées sous a, b et c ci-dessus.

CHAPITRE IV

Distribution automatique

Art. 24. - Les distributeurs automatiques sont conçus, construits, installés, nettoyés, entretenus et utilisés de manière à éviter la contamination des denrées alimentaires, y compris du fait de la présence d'insectes et d'autres animaux.

Les parties des distributeurs destinées à être en contact avec les aliments doivent être bien entretenues, faciles à nettoyer et à désinfecter. Elles doivent être maintenues en état permanent de propreté. Sans préjudice des dispositions du décret du 8 juillet 1992 susvisé, elles doivent être conçues en matériaux lisses et lavables.

Les denrées alimentaires doivent être renouvelées en temps utile de manière à rester constamment saines et en bon état de conservation. En particulier les conditions de température mentionnées à l'article 10 ci-dessus doivent être respectées et pouvoir être vérifiées à tout moment.

Les distributeurs automatiques sont munis, en tant que de besoin, d'un dispositif permettant la distribution de gobelets individuels dans des conditions hygiéniques. Une installation doit être prévue pour recueillir et éliminer régulièrement les gobelets et autres déchets.

En vue de permettre en particulier la vérification des conditions d'entretien des distributeurs automatiques par les agents des administrations chargées des contrôles, le nom de la personne responsable ainsi que son adresse et son numéro de téléphone sont apposés de manière à être lisible de l'extérieur de l'appareil.

CHAPITRE V

Transport pour livraison

Art. 25. - Les équipements de transport pour la livraison des aliments doivent être correctement entretenus et constamment maintenus en état de propreté. Leur utilisation ne doit pas constituer un risque de contamination des aliments.

Ces équipements doivent permettre si nécessaire le maintien des températures de conservation mentionnées à l'article 10 ci-dessus.

TITRE IV

DISPOSITIONS COMMUNES

Art. 26. - Les responsables des établissements mentionnés à l'article 1er ne doivent accepter aucun ingrédient, matière première, produit intermédiaire ou produit fini dont ils savent ou auraient pu estimer, en tant que professionnel et sur la base des éléments d'information en leur possession, qu'ils sont contaminés par des parasites, des micro-organismes pathogènes, par des substances toxiques ou qu'ils contiennent des corps étrangers, de manière telle qu'ils resteraient impropres à la consommation même après le triage et les autres opérations de préparation ou de transformation hygiéniquement réalisées.

Art. 27. - Pour l'application du présent arrêté, les responsables des établissements mentionnés à l'article 1er peuvent se référer à un guide de bonnes pratiques hygiéniques validé conformément à la procédure publiée au Journal officiel de la République française du 24 novembre 1993. Dans tous les secteurs où un tel guide a été élaboré, les administrations compétentes prennent en considération son application par les établissements concernés pour l'organisation et la fréquence du contrôle du respect des dispositions du présent arrêté.

Art. 28. - Les dispositions de l'arrêté du 13 septembre 1967 fixant les prescriptions d'hygiène applicables aux locaux de fabrication, d'entreposage et de vente ainsi qu'au matériel et aux conditions de manipulation en ce qui concerne les glaces et crèmes glacées, de l'arrêté du 4 octobre 1973 réglementant les conditions d'hygiène applicables dans les lieux de vente au détail des produits de la mer et d'eau douce, des titres II et IV de l'arrêté du 26 juin 1974 susvisé, pour ce qui concerne les établissements visés au présent arrêté, et de l'arrêté du 26 septembre 1980 réglementant les conditions d'hygiène applicables dans les établissements de restauration où sont préparés, servis ou distribués

des aliments comportant des denrées animales, en qui concerne les établissements visés au présent arrêté, sont abrogées.

Art. 29. - Le directeur général de la santé, le directeur général de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes et le directeur général de l'alimentation sont chargés, chacun en ce qui concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au Journal officiel de la République française.

Fait à Paris, le 9 mai 1995.

Le ministre de l'économie,
Pour le ministre et par délégation :
Le directeur général de la concurrence,
de la consommation et de la répression des fraudes,
C. BABUSIAUX

Le ministre d'État, ministre des affaires sociales, de la santé et de la ville,
Pour le ministre et par délégation :
Le directeur général de la santé,
J.-F. GIRARD Le ministre de l'agriculture et de la pêche,
Pour le ministre et par délégation :
Le directeur général de l'alimentation,
P. GUERIN

Document 4 – Arrêté du 9 mai 1995, JO du 16 mai 1995 - <http://www.legifrance.gouv.fr/>

3. Conditions hygiéniques applicables au transport des aliments

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE

Arrêté du 20 juillet 1998 fixant les conditions techniques et hygiéniques applicables au transport des aliments

NOR: AGRG9800344A

Le ministre de l'économie, des finances et de l'industrie, le ministre de l'équipement, des transports et du logement et le ministre de l'agriculture et de la pêche,

Vu l'accord relatif aux transports internationaux de denrées périssables et aux engins spéciaux à utiliser pour ces transports (ATP);

Vu l'Accord européen relatif au transport international des marchandises dangereuses par route (ADR);

Vu la directive 89/108/CEE du Conseil du 21 décembre 1988 relative au rapprochement des législations des États membres concernant les aliments surgelés destinés à l'alimentation humaine;

Vu la directive 89/437/CEE du Conseil du 20 juin 1989 concernant les problèmes d'ordre hygiénique et sanitaire relatifs à la production et à la mise sur le marché des ovoproduits;

Vu la directive 90/667/CEE du Conseil du 27 novembre 1990 arrêtant les règles sanitaires relatives à l'élimination et à la transformation des déchets animaux, à leur mise sur le marché et à la protection contre les agents pathogènes des aliments pour animaux d'origine animale ou à base de poisson et modifiant la directive 90/425/CEE;

Vu la directive 91/492/CEE du Conseil du 15 juillet 1991 fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des mollusques bivalves vivants;

Vu la directive 91/493/CEE du Conseil du 22 juillet 1991 fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des produits de la pêche;

Vu la directive 91/495/CEE du Conseil du 27 novembre 1991 concernant les problèmes sanitaires et de police sanitaire relatifs à la production et à la mise sur le marché de viandes de lapin et de viandes de gibier d'élevage;

Vu la directive 91/497/CEE du Conseil du 29 juillet 1991 modifiant et codifiant la directive n° 64-433 (CEE) relative à des problèmes sanitaires en matière d'échanges intracommunautaires de viandes fraîches pour l'étendre à la production et la mise sur le marché de viandes fraîches;

Vu la directive 92/1/CEE de la Commission du 13 janvier 1992 relative au contrôle des températures dans les moyens de transport et les locaux d'entreposage et de stockage des aliments surgelés destinés à l'alimentation humaine;

Vu la directive 92/5/CEE du Conseil du 10 février 1992 portant modification et mise à jour de la directive 77/99/CEE relative à des problèmes sanitaires en matière d'échanges intracommunautaires de produits à base de viande;

Vu la directive 92/45/CEE du Conseil du 16 juin 1992 concernant les problèmes sanitaires et de police sanitaire relatifs à la mise à mort du gibier sauvage et à la mise sur le marché de viandes de gibier sauvage;

Vu la directive 92/46/CEE du Conseil du 16 juin 1992 arrêtant les règles sanitaires pour la production et la mise sur le marché de lait cru, de lait traité thermiquement et de produits à base de lait;

Vu la directive 92/116/CEE du Conseil du 17 décembre 1992 portant modification et mise à jour de la directive 71/118/CEE relative à des problèmes sanitaires en matière d'échanges de viandes fraîches de volailles;

Vu la directive 93/43/CEE du Conseil du 14 juin 1993 relative à l'hygiène des denrées alimentaires;

Vu la directive 94/65/CEE du Conseil du 14 décembre 1994 établissant les exigences applicables à la production et à la mise sur le marché de viandes hachées et de préparations de viandes;

Vu la décision 94/371/CEE du Conseil du 20 juin 1994 arrêtant certaines conditions sanitaires spécifiques concernant la mise sur le marché de certains types d'œufs;

Vu le code rural, notamment ses articles 258 à 262;

Vu le code de la consommation;

Vu le décret n° 64-949 du 9 septembre 1964 modifié portant règlement d'administration publique en ce qui concerne les produits surgelés pour l'application de la loi du 1er août 1905 sur la répression des fraudes;

Vu le décret n° 67-295 du 31 mars 1967 pour l'application des articles 258, 259 et 262 du code rural et relatif à l'organisation et au fonctionnement de l'inspection sanitaire et qualitative des animaux vivants et des denrées animales ou d'origine animale;

Vu le décret n° 71-636 du 21 juillet 1971 pris pour l'application des articles 258, 259 et 262 du code rural et relatif à l'inspection sanitaire et qualitative des animaux vivants et des denrées animales ou d'origine animale;

Vu le décret du 7 avril 1988 portant approbation du contrat type pour le transport public routier de marchandises sous température dirigée;

Vu le décret n° 91-409 du 26 avril 1991 fixant les prescriptions en matière d'hygiène concernant les denrées, produits ou boissons destinés à l'alimentation humaine, à l'exclusion de ceux mentionnés aux articles 258, 259 et 262 du code rural, des eaux destinées à la consommation humaine et des eaux minérales naturelles, notamment ses articles 2, 3, 4, 17 et 20;

Vu le décret n° 92-699 du 23 juillet 1992 relatif à certaines infractions commises par les employeurs de salariés affectés à la conduite de véhicules de transport routier de personnes ou de marchandises et par les donneurs d'ordres aux transporteurs routiers de marchandises;

Document 5 – Arrêté du 20 juillet 1998, JO du 6 août 1998 - <http://www.legifrance.gouv.fr/>

Vu l'arrêté du 30 décembre 1991 relatif à la transformation des déchets animaux et régissant la production d'aliments pour animaux d'origine animale;

Vu l'arrêté du 9 mai 1995 réglementant l'hygiène des aliments remis directement au consommateur;

Vu l'arrêté du 28 mai 1997 relatif aux règles d'hygiène applicables à certains aliments et préparations alimentaires destinés à la consommation humaine;

Vu l'arrêté du 29 septembre 1997 relatif aux conditions d'hygiène applicables dans les établissements de restauration collective à caractère social,

Arrêtent :

TITRE I^{er} CHAMP D'APPLICATION

Art. 1^{er}. - Le présent arrêté fixe les conditions sanitaires et techniques applicables au transport des aliments mentionnés aux articles 1^{er} des décrets n° 71-636 du 21 juillet 1971 et n° 91-409 du 26 avril 1991 susvisés ainsi que de certains déchets animaux, et aux moyens de transport de ces aliments.

Sont exclus du champ d'application du présent arrêté les produits bruts issus de récoltes et les sous-produits non destinés à l'alimentation humaine, tels que ceux prévus à l'annexe I.

Les dispositions des titres II, IV, V et VII sont applicables à l'ensemble des aliments. Celles du titre III et du titre VI s'appliquent en outre aux aliments de la catégorie 3 telle que définie à l'annexe I du présent arrêté.

Art. 2. - Pour l'application du présent arrêté, il faut entendre par :

« Aliments » : les denrées, boissons ou produits destinés à l'alimentation humaine définis au premier alinéa de l'article 1^{er}.

« Collecte locale » : la partie des opérations réalisées par des moyens de transport d'aliments pour permettre la collecte successive de marchandises, au cours d'une même tournée dont la durée n'excède pas huit heures. Cette durée s'entend :

- de l'ouverture de porte nécessaire au premier chargement;
- à l'ouverture de porte nécessaire au dernier chargement.

« Distribution locale » : une tournée de livraison d'aliments destinés à être délivrés à des acheteurs finals ou des utilisateurs finals, dont la durée n'excède pas huit heures. Cette durée s'entend :

- de l'ouverture de porte nécessaire à la première livraison;
- à l'ouverture de porte nécessaire à la dernière livraison, et lorsque la totalité des aliments n'a pas été livrée, au retour à la base.

« Enregistreurs de température approuvés » : les instruments d'enregistrement de la température de l'air qui équipent les engins affectés au transport d'aliments surgelés sont considérés comme approuvés au sens du présent arrêté s'ils satisfont aux conditions suivantes :

- ils sont conformes à la norme NF E 18 150, ou son équivalent CEN;
- ils ont fait l'objet d'une publication par arrêté conjoint du ministre en charge de l'agriculture, du ministre en charge de la consommation et du ministre en charge de l'industrie, au Journal officiel de la République française.

« Conteneurs » :

a) Les caisses mobiles pour tous types de transports, et notamment le transport multimodal;

b) Les conteneurs maritimes, et notamment ceux visés par la norme ISO 1496 (partie 2 : containers à caractéristiques thermiques);

c) Les petits conteneurs, d'un volume inférieur à deux mètres cubes.

« Moyen de transport » : wagons, camions, camionnettes, fourgons, fourgonnettes, véhicules particuliers à usage professionnel, remorques, semi-remorques, citernes, points de vente automobiles ou conteneurs ainsi que tout contenant transporté par voie terrestre, maritime, aérienne ou une combinaison de ces possibilités, et autres engins analogues servant au transport d'aliments.

« Responsable du transport » :

1. Toute personne morale ou physique qui déplace des aliments soit

pour son propre compte soit pour le compte d'autrui;

2. Toute personne morale ou physique exploitant un point de vente automobile.

« Point de vente automobile » : voiture-boutique ou tout autre moyen de transport utilisé alternativement pour le transport, le cas échéant la préparation, et pour la cession d'aliments au consommateur final à titre onéreux ou gratuit.

« Retours ou invendus » : produits alimentaires qui n'ont pas été acceptés par leur destinataire ou dont la commercialisation en l'état n'est plus envisagée, et qui sont transportés vers leur lieu d'expédition initial ou vers tout autre lieu.

TITRE II DISPOSITIONS GÉNÉRALES RELATIVES À L'UTILISATION DES MOYENS DE TRANSPORT DE TOUS LES ALIMENTS

Chapitre I^{er} Conditions de conception et d'équipement des moyens de transport

Art. 3. - Les moyens de transport des aliments visés au présent arrêté sont conçus de telle sorte qu'ils :

1. Permettent de protéger les aliments des causes susceptibles de les contaminer ou de les altérer pendant toute la durée du transport;
2. Soient faciles à nettoyer et à désinfecter.

Art. 4. - Pour les véhicules routiers, la partie des moyens de transport destinée à recevoir les denrées animales ou d'origine animale est sans communication avec la cabine du conducteur.

Toutefois, dans le cas des véhicules particuliers ou des fourgonnettes à usage professionnel, l'utilisation d'un récipient hermétique au besoin isolé thermiquement, séparant les denrées animales ou d'origine animale du reste de l'habitacle peut pallier l'existence de communication.

Art. 5. - La partie des moyens de transport destinée à recevoir les aliments est libre d'aménagements et accessoires sans rapport avec le chargement des aliments visés par le présent arrêté.

Elle satisfait aux conditions suivantes :

a) Les revêtements intérieurs, y compris le plancher et le plafond, sont fabriqués à l'aide de matériaux résistants à la corrosion, imperméables, imputrescibles, faciles à nettoyer, laver et désinfecter, ne sont pas susceptibles d'altérer les caractères organoleptiques des aliments ou de les rendre nocifs pour la santé humaine;

b) Les revêtements intérieurs, y compris le plancher et le cas échéant le plafond, sont dépourvus d'aspérités à l'exception de celles nécessitées par l'équipement et les dispositifs de fixation du chargement. Le cas échéant, ces dispositifs sont faciles à nettoyer et désinfecter;

c) Les matériaux de tous ordres susceptibles d'entrer en contact avec les aliments transportés sont conformes aux dispositions légales et réglementaires et non susceptibles d'altérer ces aliments ou de leur communiquer des propriétés nocives ou anormales;

d) L'ensemble des dispositifs concernant la fermeture des engins, la ventilation et l'aération, lorsque celle-ci est nécessaire, permettent le transport des aliments à l'abri de toute souillure, poussière, insectes et animaux indésirables.

Chapitre II Hygiène du transport

Art. 6. - Les aliments en vrac sous forme de granulés ou en poudre, ou à l'état liquide, doivent être transportés dans des conteneurs, citernes ou tout autre réceptacle réservé au transport d'aliments, sur lesquels figure de façon clairement visible et indélébile la mention « réservé aux denrées alimentaires » ou toute autre mention similaire.

Toutefois, une dérogation à l'obligation de transport d'aliments dans des moyens réservés à cet usage est accordée pour certains produits dans des conditions fixées par arrêté conjoint du ministre en charge de l'agriculture et du ministre en charge de la consommation.

Art. 7. - Sans préjudice des dispositions prévues à l'article 6, il est interdit de prendre en charge avant, pendant ou après un transport d'aliments un fret susceptible d'altérer les caractéristiques sanitaires

et qualitatives des aliments par contaminations, émanations, pollutions ou apports toxiques tel que:

- a) Des marchandises dangereuses classées toxiques et/ou corrosives au sens de l'Accord européen relatif au transport international des marchandises dangereuses par route (ADR) à l'exclusion des boissons alcoolisées et des produits d'entretien, de droguerie et d'hygiène conditionnés en unité de vente destinés aux utilisateurs finals;
- b) Des matières à haut risque définies aux points 1, 2, 3, 4 et 8 de l'annexe I de l'arrêté du 30 décembre 1991 susvisé;
- c) Des animaux vivants.

Par ailleurs, la prise en charge d'un fret constitué par des marchandises autres que celles citées aux points a, b et c est autorisée aux conditions suivantes:

- s'il s'agit d'un transport concomitant au transport d'aliments, la séparation physique entre les produits est suffisante pour assurer le respect des conditions en matière d'hygiène énoncées dans le présent arrêté, notamment pour prévenir les risques de contamination, modification ou altération des aliments, en particulier par des odeurs, poussières, souillures, parcelles organiques ou minérales;
- s'il s'agit d'un transport effectué avant le transport d'aliments, les engins et le matériel utilisés sont si nécessaire nettoyés et désinfectés avant la prise en charge d'aliments.

Art. 8. - Les engins et le matériel utilisés pour le transport des aliments sont maintenus en bon état d'entretien. Ils sont en outre constamment tenus en bon état de propreté.

Chapitre III

Hygiène et formation des personnes

Art. 9. - Les personnes amenées à manipuler les aliments sont tenues à la plus grande propreté corporelle et vestimentaire, et, le cas échéant, elles portent des vêtements adaptés.

Toute personne malade ou porteuse de germes transmissibles est écartée de la manipulation des aliments lorsqu'il existe un risque de contamination directe ou indirecte.

Art. 10. - Le responsable du transport s'assure que, dans le cadre de son activité et de la responsabilité qui s'y attache, les personnes qui manipulent ou manutentionnent les aliments au cours du transport et, le cas échéant, au cours des opérations de chargement et de déchargement, suivent des instructions précises leur permettant d'appliquer les dispositions du présent arrêté et disposent d'une formation en matière d'hygiène des aliments renouvelée et adaptée à leur activité professionnelle.

Chapitre IV

Autocontrôles et vérifications

Art. 11. - Le responsable du transport identifie tout aspect de son activité qui est déterminant pour la sécurité des aliments transportés et veille à ce que des procédures de sécurité appropriées soient établies, mises en œuvre, respectées et mises à jour en se fondant sur des principes utilisés pour développer le système d'analyses des dangers et de points critiques pour leur maîtrise, dit système HACCP. Il doit en particulier:

1. Analyser et évaluer les dangers potentiels aux différentes étapes du transport, y compris au cours des opérations de chargement et de déchargement;
2. Mettre en évidence les niveaux et moments (les points) où des risques alimentaires peuvent se présenter;
3. Établir lesquels de ces points sont critiques pour la sécurité des aliments (les points critiques);
4. Définir et mettre en œuvre, au niveau de chacun de ces points critiques, des procédures de contrôle permettant de s'assurer de leur maîtrise;
5. Définir les actions correctives à mettre en œuvre lorsqu'un contrôle révèle qu'un point critique n'est plus maîtrisé ou n'a pas été maîtrisé à un moment donné;
6. Définir et mettre en œuvre des procédures spécifiques de vérification et de suivi de l'efficacité de l'ensemble des procédures ainsi mises en place;
7. Revoir périodiquement et à chaque modification des opérations de transport l'analyse des dangers, les points critiques ainsi que leurs

procédures de vérification et de suivi.

Le responsable du transport est en mesure de porter à la connaissance des agents de contrôle la nature, la périodicité et le résultat des vérifications définies selon les principes mentionnés à l'alinéa précédent, dûment documentés, ainsi que, s'il y a lieu, le nom du laboratoire de contrôle.

Art. 12. - Le responsable du transport procède à des contrôles réguliers pour vérifier la conformité des moyens de transport et des opérations effectuées aux dispositions du présent arrêté. Ces contrôles permettent notamment de s'assurer:

- que le matériel utilisé est adapté aux denrées à transporter et en bon état de fonctionnement;
- que les températures exigées pour les produits sont respectées, y compris pendant le chargement et le déchargement;
- que les méthodes de nettoyage et de désinfection sont efficaces et adaptées.

Art. 13. - Pour établir la nature et la périodicité des contrôles prévus au présent chapitre, le responsable du transport peut se référer comme moyen d'application du présent arrêté à un guide de bonnes pratiques hygiéniques validé conformément à la procédure publiée au Journal officiel de la République française du 24 novembre 1993, notamment en ce qui concerne l'analyse des dangers prévue à l'article 11.

TITRE III

DISPOSITIONS COMPLÉMENTAIRES RELATIVES AU TRANSPORT DES PRODUITS ALTÉRABLES OU NON STABLES A TEMPÉRATURE AMBIANTE

Art. 14. - Le présent titre fixe les conditions sanitaires et techniques spécifiques applicables aux denrées dont la conservation exige le maintien à température dirigée dans les conditions précisées à l'annexe II du présent arrêté.

Chapitre I^{er}

Généralités

Art. 15. - La partie des moyens de transport destinée à recevoir des aliments est fermée de façon à éviter les contaminations et les remontées de température.

Art. 16. - Sans préjudice des dispositions énoncées à l'article 7, les denrées nues et les aliments conditionnés sont transportés dans des moyens de transport distincts, à moins qu'il existe, dans le même moyen de transport, une séparation physique adéquate protégeant les denrées nues des aliments conditionnés.

Au cours des opérations de chargement et de déchargement, et tout au long du transport, toutes précautions sont prises pour que les aliments ne soient pas souillés ou contaminés. Ils ne doivent pas entrer en contact avec le sol, le plancher ou les agencements susceptibles de le recouvrir, lorsqu'ils ne sont pas disposés dans un contenant résistant les enveloppant complètement.

Chapitre II

Choix des moyens de transport

Art. 17. - Ne peuvent être désignés comme engins isothermes, dotés ou non d'un dispositif thermique, réfrigérants, frigorifiques ou calorifiques que les engins qui répondent aux définitions et normes des engins spéciaux pour le transport des aliments définies dans l'annexe I de l'Accord international sur le transport des denrées périssables, publiée au Journal officiel de la République française par le ministre en charge de l'agriculture sous forme d'avis aux transporteurs de denrées périssables.

L'avis aux transporteurs de denrées périssables décrit en outre les méthodes d'essai et de contrôle appliquées aux moyens de transport isothermes, réfrigérants, frigorifiques ou calorifiques, les conditions d'attribution et le modèle de l'attestation de conformité technique et de l'attestation de conformité sanitaire délivrées par l'administration, les marques d'identification à apposer sur ces engins et la nature des documents qui doivent les accompagner au cours de leur déplacement.

Art. 18. - Les aliments altérables dont la conservation exige le maintien à température dirigée doivent être présentés en vue de leur transport et doivent être tenus au cours du transport sous un des états et dans les conditions de température limites, en tout point des aliments, fixées à l'annexe II du présent arrêté ou, lorsqu'il s'agit d'une livraison au consommateur final, dans les conditions de température mentionnées à l'annexe de l'arrêté du 9 mai 1995 susvisé.

Le choix du moyen de transport est défini en annexe II en fonction des températures en tout point des aliments.

Seuls peuvent être utilisés pour le transport des aliments à l'état congelé les moyens de transport appartenant aux catégories Frigorifique renforcé de classe C ou F, ou Réfrigérant renforcé de classe C, telles que définies dans l'annexe I de l'Accord international sur le transport des denrées périssables.

Seuls peuvent être utilisés pour le transport des aliments à l'état réfrigéré les moyens de transport appartenant à la catégorie isotherme, équipés ou non d'un dispositif thermique frigorifique, réfrigérant ou calorifique.

Art. 19. - Toutefois, pour :

a) Le transport réalisé à l'occasion de conditions climatiques rigoureuses avérées, rendant manifestement superflue une production de froid pendant toute la durée du transport, ou

b) Le transport de tout aliment à l'état réfrigéré ou congelé, sur une distance depuis le lieu de chargement inférieure à 80 km sans rupture de charge, ou

c) Le transport en citerne non dotée d'isolation thermique des laits et crèmes destinés à l'industrie sur une distance depuis le lieu de chargement inférieure à 200 km sans rupture de charge, ou

d) Le transport en citerne de catégorie isotherme normal déclassé des liquides réfrigérés sur une distance depuis le lieu de chargement inférieure à 600 km sans rupture de charge, ou

e) Le transport de produits de la pêche congelés d'un entrepôt frigorifique vers un établissement agréé pour y être décongelés dès leur arrivée, en vue d'une préparation, lorsque la distance à parcourir est courte, n'excédant pas 50 km ou une heure de trajet, ou

f) Les transports Air-Terre (et Terre-Air) ou Mer-Terre (et Terre-Mer) réalisés dans des conteneurs aériens ou maritimes sans transbordement de marchandises,

le responsable du transport peut choisir d'utiliser un autre moyen de transport sous réserve :

- qu'il vérifie, notamment au moyen de l'analyse des dangers liés à son activité telle que décrite à l'article 11 du présent arrêté, que les températures réglementaires figurant en annexe II sont maintenues pendant toute la durée du transport et que les conditions d'hygiène sont respectées;
- qu'il se conforme le cas échéant aux dispositions des articles 51 à 55.

Chapitre III

Maîtrise des températures au cours du transport

Art. 20. - Pour les aliments réfrigérés, les températures minimales sont strictement supérieures à la température de congélation débutante propre à chaque aliment.

Des aliments dont les températures réglementaires de conservation sont différentes peuvent être transportés simultanément dans le même engin de transport, sous réserve que la température limite respective de l'aliment le plus sensible soit maintenue et respectée.

Art. 21. - Toutes dispositions sont prises pour que les opérations de chargement et de déchargement soient exécutées avec un maximum de célérité et sans qu'il en résulte de remontée de température préjudiciable à la qualité des aliments.

Pour de courtes périodes limitées aux opérations de manutention lors des opérations de chargement et de déchargement des aliments, il peut être toléré, à la surface de l'aliment, une légère élévation de température. Pour des aliments surgelés, cette élévation ne pourra dépasser 3 °C, de sorte que la température à la surface des aliments n'excède jamais -15 °C.

Art. 22. - La mise à la température de transport de la partie du moyen de transport destinée à recevoir les aliments est effectuée avant le chargement lorsque la température extérieure ou la température du moyen de transport, et notamment celle de ses parois, peuvent être la cause d'une remontée en température des aliments préjudiciable à leur bonne conservation.

Art. 23. - Le chargement est disposé de façon que la circulation de l'air soit convenablement assurée.

Art. 24. - Des thermomètres permettent d'apprécier pendant toute la durée du transport la température de l'air à laquelle sont soumis les aliments transportés et, dans le cas d'un transport de liquide non conditionné, la température du liquide.

La ou les partie(s) thermosensible(s) de ces appareils sont convenablement placée(s) pour mesurer la température la plus représentative de l'air. Dans le cas des caisses compartimentées, la température propre à chaque compartiment est indiquée.

L'indication de la température est clairement lisible et facilement accessible.

Art. 25. - Sans préjudice de l'attestation de conformité qui est délivrée, la partie des moyens de transport destinée à recevoir les aliments suivants est équipée d'instruments approuvés d'enregistrement automatique de la température pour mesurer fréquemment et à intervalles réguliers la température de l'air :

- a) Les aliments surgelés destinés à l'alimentation humaine ;
- b) Les viandes hachées et préparations de viandes à l'état réfrigéré ou congelé, y compris les surgelés, pour tout transport d'une durée supérieure à une heure.

Art. 26. - Les dispositions de l'article précédent ne s'appliquent pas :

1^{er} Lorsque l'enregistrement de la température de l'air n'est pas représentatif de l'évolution de la température des denrées, à savoir :

- a) Lors de la collecte locale ;
- b) Lors de la distribution locale ;

2^e Lorsqu'un transport de faible volume rend cet enregistrement inadapté comme outil de maîtrise de la chaîne du froid, et notamment lors du transport en petits conteneurs acheminés fermés sans ouverture de porte ni rupture de charge vers le destinataire final.

Art. 27. - Chaque enregistreur est identifié individuellement avant sa mise en service et son numéro est associé sans ambiguïté au chargement auquel il se rapporte. Ce numéro figure notamment sur l'un des documents réglementairement prévus mentionnés à l'article 43 du présent arrêté, ou dans le dossier du véhicule à son lieu de rattachement.

Art. 28. - Les enregistrements de température obtenus sont datés, classés par ordre chronologique et conservés par les responsables du transport pendant au moins un an.

Ils doivent :

- permettre d'identifier les opérations de transport qu'ils concernent ;
- préciser l'emplacement du ou des capteurs désignés ;
- pouvoir être consultés par les agents chargés du contrôle soit immédiatement sur le lieu du contrôle, soit de façon différée au point de déchargement ou de chargement ou au lieu de rattachement du véhicule.

Toute l'aide nécessaire à l'exploitation des enregistrements doit être apportée aux agents.

Art. 29. - En ce qui concerne les engins déjà équipés d'enregistreurs fiables et non approuvés à la date de publication du présent arrêté, leurs propriétaires pourront conserver à titre dérogatoire ces appareils pendant six ans à compter de la publication du premier avis aux transporteurs d'aliments surgelés (Journal officiel de la République française du 17 février 1995).

En outre, tous les enregistreurs font l'objet d'une vérification périodique tous les deux ans, par un organisme agréé figurant sur une liste ayant

fait l'objet d'un arrêté conjoint du ministre en charge de l'agriculture, du ministre en charge de la consommation et du ministre en charge de l'industrie, publié au Journal officiel de la République française.

Chapitre IV

Dispositions spécifiques complémentaires

Art. 30. - Transport des viandes et abats d'animaux de boucherie. - La partie des moyens de transport réservée aux viandes de boucherie en carcasses, demi-carcasses ou demi-carcasses découpées en un maximum de trois morceaux ou des quartiers de viandes de boucherie et de gros gibier sauvage et d'élevage ainsi que de la viande découpée non emballée, est munie de dispositifs de suspension en matériaux résistants à la corrosion, utilisés de telle façon que les viandes ne puissent pas toucher le plancher.

Les carcasses, demi-carcasses ou demi-carcasses découpées en un maximum de trois morceaux, les quartiers de viande, les autres morceaux et abats sont transportés suspendus ou placés sur des supports s'ils ne sont pas inclus dans des emballages ou contenus dans des récipients en matériaux résistants à la corrosion.

Les engins équipés de dispositifs porte-viandes ne sont pas autorisés à transporter des aliments en vrac, à l'état granulaire ou poudreux.

Les viscères sont toujours transportés dans des emballages ou récipients résistants et étanches aux liquides et aux corps gras. En outre, les estomacs et les intestins réfrigérés ne peuvent être transportés que s'ils sont vidés et nettoyés, les têtes et les pattes que si elles sont dépouillées ou échaudées et épluchées.

L'ensemble des supports, emballages ou récipients mentionnés à cet article doivent satisfaire aux exigences de l'hygiène. Ils ne peuvent être réutilisés qu'après avoir été nettoyés et désinfectés.

Art. 31. - Transport des produits de la pêche et des coquillages vivants. - 1^{er} Produits de la pêche :

a) Les produits de la pêche frais ou décongelés ainsi que les produits de crustacés et mollusques cuits et réfrigérés sont maintenus à la température de la glace fondante ;

b) Si de la glace est utilisée pour la réfrigération des produits, l'écoulement de l'eau de fusion est assurée afin d'éviter que cette eau séjourne au contact des produits. La glace utilisée est fabriquée à partir d'eau potable ou d'eau de mer propre ;

c) Les conditions de transport des produits de la pêche à l'état vivant ne doivent pas avoir d'effet négatif sur la viabilité de ces produits. Pour les poissons transportés à l'état vivant dans de l'eau, la qualité de celle-ci est suffisante pour ne pas transmettre aux animaux des organismes ou des substances nuisibles.

2^o Coquillages vivants :

a) Les moyens de transport utilisés pour les envois de coquillages vivants sont pourvus de dispositifs efficaces assurant la protection des coquillages contre les températures extrêmes, chaudes ou froides, la poussière ou les souillures, ainsi que contre les dégâts occasionnés aux coquilles par les vibrations, l'abrasion et l'écrasement. Les véhicules et conteneurs sont fermés et maintiennent les produits à une température n'ayant pas d'effet nocif sur leur température et leur vitalité ;

b) Les colis contenant les mollusques bivalves vivants ne peuvent pas être transportés à même le sol du véhicule ou du conteneur qui doit être pourvu de caillottes ou d'un autre dispositif évitant ce contact ;

c) S'il est utilisé de la glace pour le transport des coquillages vivants, celle-ci doit avoir été obtenue à partir d'eau potable ou d'eau de mer propre. Toute aspersion des coquillages durant le transport ou au déchargement est interdite.

Art. 32. - Transport des œufs en coquille non réfrigérés. - Les œufs en coquille non réfrigérés sont transportés dans des conditions telles qu'ils soient maintenus propres, secs et exempts d'odeurs étrangères, préservés efficacement des chocs, des intempéries et des écarts de température, notamment par action des rayonnements lumineux.

Art. 33. - Transport des aliments destinés aux animaux de compagnie. - Lorsque des aliments destinés aux animaux de compagnie sont transportés en même temps que des denrées alimentaires destinées à la consommation humaine, outre les précautions hygiéniques particulières qui s'imposent, tout est mis en œuvre pour prévenir tout risque de confusion sur leur destination.

Art. 34. - Transport des retours ou invendus. - Sans préjudice des réglementations en vigueur, lorsqu'est effectué un transport de retours et invendus, la mention explicitant le motif du transport et la destination des produits doit figurer sur le document d'accompagnement prévu à l'article 43.

Art. 35. - Transport des produits d'origine animale destinés à la transformation. - Les produits d'origine animale destinés à la transformation sont collectés et transportés vers les établissements de transformation dans des récipients ou moyens de transport étanches, empêchant toute pollution. Les récipients ou moyens de transport sont convenablement fermés.

Les moyens de transport, les récipients et les bâches réutilisables sont conservés en bon état de propreté.

Le transport des matières premières d'origine animale destinées à la fabrication d'aliments pour animaux, de produits pharmaceutiques ou industriels est effectué conformément aux instructions imposées par les réglementations spécifiques à ces produits, notamment en ce qui concerne la température et le marquage.

TITRE IV

DISPOSITIONS SPÉCIFIQUES

A CERTAINS MOYENS DE TRANSPORT

Chapitre I^{er}

Les citernes

Art. 36. - Les citernes et autres récipients utilisés pour le transport des aliments à l'état liquide, sous forme de granulés ou en poudre sont lavés, nettoyés et, si nécessaire, désinfectés à une fréquence définie sur la base d'une analyse des dangers telle que prévue à l'article 11, de manière à prévenir les risques de contamination des aliments transportés.

Art. 37. - Les citernes et autres récipients utilisés pour le transport des liquides alimentaires permettent un écoulement total du liquide ; s'ils sont pourvus de robinets, ceux-ci sont facilement retirés et démontés, lavés et désinfectés.

Art. 38. - À l'exception des cas mentionnés à l'article 19, seules les citernes de catégorie frigorifique sont utilisées pour le transport d'aliments d'origine animale à l'état liquide dont la conservation nécessite le maintien à température dirigée.

Art. 39. - Conformément aux dispositions de l'article 24, lorsque les citernes comportent plusieurs compartiments, chaque compartiment est équipé d'un thermomètre. Toutefois, lorsque les citernes sont équipées d'un dispositif thermique assurant le refroidissement simultané de tous les compartiments, un seul thermomètre est suffisant.

Par ailleurs, lorsque des aliments sont transportés sous température dirigée en citerne, la mise en œuvre de moyens de maîtrise dûment documentés apportant les mêmes informations et garanties en matière de respect de la chaîne du froid peuvent se substituer aux obligations prévues à l'article 24.

Chapitre II

Les conteneurs

Art. 40. - Les conteneurs reçoivent à l'état neuf ou lors de leur mise en service un numéro d'identification unique délivré par le fabricant ou par le bureau international des conteneurs pour les conteneurs maritimes.

Art. 41. - Lorsque des aliments sont transportés sous température dirigée au moyen de petits conteneurs, une procédure ou un dispositif dûment documentés apportant les mêmes informations et garanties en matière de maîtrise de la chaîne du froid peut se substituer aux obligations prévues aux articles 24 à 29.

Chapitre III

Les points de vente automobiles

Art. 42. - Sans préjudice des dispositions de l'arrêté du 9 mai 1995 susvisé, pour les points de vente automobiles une communication peut être admise avec la cabine du conducteur sous réserve qu'il s'agisse

d'une porte assurant une fermeture efficace maintenue constamment fermée pendant les déplacements et la vente.

En outre, tous les dispositifs de fermeture de ces points de vente automobiles sont maintenus fermés pendant leurs déplacements et, d'une façon générale, en dehors de la vente, sauf pour les opérations habituelles d'entretien, de chargement et de déchargement.

TITRE V DISPOSITIONS RELATIVES À LA DÉSIGNATION ET À L'ÉTAT DES MARCHANDISES

Art. 43. - Avant l'exécution d'un transport d'aliments, le responsable du transport indique sur l'un des documents d'accompagnement réglementairement prévus selon les types de transport les renseignements suivants :

- la désignation des aliments à transporter ;
- lorsqu'il s'agit de transport sous température dirigée, leur état physique ;
- lorsqu'il s'agit de produits transportés dans un réceptacle et/ou conteneur/citerne réservé aux denrées alimentaires dans les conditions dérogatoires prévues à l'article 6, leur désignation ainsi que leur utilisation ultérieure ;
- leur point de départ ;
- leur destination.

Art. 44. - Le document prévu à l'article 43 doit être présenté à toute réquisition des agents en charge du contrôle.

TITRE VI VÉRIFICATION ET ATTESTATION DE LA CONFORMITÉ DES MOYENS DE TRANSPORT

Art. 45. - Les moyens de transport de certains aliments doivent être soumis avant leur mise en service à un examen destiné à vérifier que les prescriptions du présent arrêté les concernant sont observées, et notamment qu'ils sont aptes à acheminer les aliments :

- dans les conditions de température réglementaires (vérification de conformité technique de la caisse et, le cas échéant, du dispositif thermique) ;
- dans les conditions d'hygiène réglementaires (vérification de conformité sanitaire).

Chapitre I^{er}

Moyens de transport mentionnés à l'article 18

Art. 46. - Les dispositions du présent chapitre s'appliquent aux moyens de transport isothermes, dotés ou non d'un dispositif thermique, réfrigérants, frigorifiques ou calorifiques, soumis aux dispositions de l'article 18.

Afin que ces moyens de transport soient soumis à l'examen prévu à l'article 45, une demande est adressée par leurs propriétaires :

- au directeur des services vétérinaires du département d'immatriculation en ce qui concerne les véhicules routiers, ou au directeur des services vétérinaires du département d'utilisation, lorsque celui-ci diffère de celui de l'immatriculation ;
- au directeur des services vétérinaires du département du siège géographique de l'entreprise où sont fabriqués les conteneurs, ou au directeur des services vétérinaires du département de l'importateur ou de l'utilisateur en ce qui concerne les conteneurs fabriqués dans un autre Etat.

Le directeur des services vétérinaires précise aux propriétaires le lieu où les moyens de transport sont présentés en vue de l'examen.

Section 1 Conformité technique

Art. 47. - À l'issue de l'examen prévu à l'article 45, et si les résultats sont favorables, une attestation de conformité technique est délivrée aux propriétaires des moyens de transport par le directeur des services vétérinaires du département d'immatriculation.

Les attestations de conformité techniques délivrées ont trait à leur catégorie (isotherme, réfrigérant, frigorifique, calorifique) et à leur classe telles que définies dans l'annexe 1 de l'Accord international sur le transport des denrées périssables.

Art. 48. - L'attestation de conformité technique initiale est valable six ans pour tous les moyens de transport neufs (caisse et dispositif thermique) visés à l'article 18 à compter de la date de construction de la caisse même si l'engin n'a pas été exploité depuis cette date, ou à compter de la date de construction du dispositif thermique lorsque la caisse est équipée d'un dispositif thermique d'occasion.

Avant expiration de cette validité, le propriétaire sollicite le renouvellement de l'attestation de conformité technique auprès du directeur des services vétérinaires concernés qui lui précise le lieu où le moyen de transport doit être présenté en vue de la visite de renouvellement.

Section 2 Conformité sanitaire

Art. 49. - En outre, il est délivré aux moyens de transport visés à l'article 18 une attestation de conformité sanitaire, attestant la conformité de ces engins aux conditions hygiéniques et sanitaires énoncées dans le présent arrêté.

L'attestation initiale est valable :

Trois ans pour tous les moyens de transport visés à l'article 18 (y compris les citernes), à l'exception des petits conteneurs ;

Six ans pour les petits conteneurs conformes aux dispositions de l'article 18.

Avant expiration de la validité, le propriétaire sollicite l'intervention du directeur des services vétérinaires concernés qui lui précise l'endroit où le moyen de transport est présenté en vue d'une visite de renouvellement de l'attestation de conformité sanitaire. Cette attestation de renouvellement est valable trois ans.

Art. 50. - Le renouvellement des attestations de conformité technique et sanitaire est effectué à chaque fois qu'intervient un changement de propriétaire ou une modification importante de l'engin, ou dès lors que l'autorité administrative le requiert.

Chapitre II Autres moyens de transport

Art. 51. - Les dispositions du présent chapitre s'appliquent :

- aux moyens de transport d'aliments altérables de la catégorie 3 de l'annexe I du présent arrêté, lorsqu'ils ne sont pas soumis aux dispositions de l'article 18 ;
- aux moyens de transport faisant l'objet des dispositions de l'article 19, alinéas b, c et d ;
- aux points de vente automobile.

Art. 52. - Afin que les engins soient soumis à l'examen prévu à l'article 45, une demande est adressée par leurs propriétaires :

- au directeur des services vétérinaires du département d'immatriculation en ce qui concerne les véhicules routiers, ou au directeur des services vétérinaires du département d'utilisation, lorsque celui-ci diffère de celui de l'immatriculation ;
- au directeur des services vétérinaires du département de l'utilisateur en ce qui concerne les conteneurs.

Le directeur des services vétérinaires précise aux propriétaires le lieu où les engins de transport sont présentés en vue de l'examen.

Art. 53. - Il est délivré à l'issue de l'examen prévu à l'article 45 un certificat sanitaire de transport.

Le certificat sanitaire de transport est attribué pour un engin donné et des utilisations précises.

Il valide :

- a) La conformité du moyen de transport en matière de conception et d'équipement ;
- b) Son aptitude à satisfaire aux exigences en matière d'hygiène, dans les conditions décrites par le demandeur ;
- c) Le cas échéant, son aptitude au maintien de la chaîne du froid des aliments, pour les utilisations décrites par le demandeur.

Art. 54. - Le certificat sanitaire de transport est délivré par le directeur des services vétérinaires du département d'immatriculation du moyen de transport ou, lorsqu'il s'agit d'un moyen de transport non soumis à immatriculation, dans le département d'utilisation.

Avant l'échéance réglementaire d'un an pour une première délivrance et de trois ans au maximum par la suite, le propriétaire du moyen de transport sollicite l'intervention du directeur des services vétérinaires concerné qui lui précise l'endroit où le moyen de transport est présenté en vue d'une visite de renouvellement.

Cette procédure s'applique dans son ensemble à chaque changement de propriétaire, et à chaque fois qu'intervient une modification notable de l'engin, ou de l'activité exercée, ou que l'autorité administrative le requiert.

Art. 55. - Les moyens de transport visés à l'article 51, à l'exception des points de vente automobiles, doivent porter une marque « ATP » rayée d'une bande diagonale rouge aisément visible depuis l'extérieur, ou le cas échéant la mention prévue à l'article 6.

TITRE VII DISPOSITIONS FINALES

Art. 56. - Dans l'exercice de ses activités, le responsable du transport est tenu de préserver la marchandise dans un état conforme aux prescriptions réglementaires.

Il présente l'original ou la copie certifiée conforme des attestations mentionnées au titre VI, en cours de validité, à la requête des agents de contrôle.

Art. 57. - Sans préjudice des réglementations spécifiques en matière de transport et de travail, les infractions aux prescriptions du présent arrêté concernant les aliments visés à l'article 1^{er} du décret n° 71-636 du 21 juillet 1971 susvisé relèvent des peines prévues par l'article 26 de ce même décret et les infractions se rapportant aux aliments visés à l'article 1^{er} du décret no 91-409 du 26 avril 1991 susvisé relèvent des peines prévues à l'article 20 de ce même décret.

Art. 58. - Sera puni des peines mentionnées à l'article 57 le responsable du transport qui aura manqué aux dispositions du présent arrêté ainsi que, conformément aux dispositions du décret n° 92-699 du 23 juillet 1992 susvisé, tout expéditeur, commissionnaire, affréteur, mandataire, destinataire ou tout autre donneur d'ordre qui, directement ou par l'intermédiaire d'un mandataire ou d'un préposé, aura donné en connaissance de cause des directives contraires à ces dispositions.

Art. 59. - L'arrêté du 1^{er} février 1974 réglementant les conditions d'hygiène relatives au transport des denrées périssables est abrogé à compter de l'entrée en vigueur du présent arrêté.

Art. 60. - Les dispositions du présent arrêté entrent en vigueur trois mois après sa publication au Journal officiel de la République française.

Toutefois, les responsables des moyens de transport faisant l'objet des dispositions de l'article 19, alinéas b, c et d, disposent d'un délai d'un an à compter de l'entrée en vigueur du présent arrêté pour s'y conformer. Pendant cette période, ils restent soumis aux obligations de résultats en matière d'hygiène et de température en tous points des aliments.

En outre, tous les responsables des moyens de transport disposent d'un délai d'un an à compter de l'entrée en vigueur du présent arrêté pour répondre aux dispositions spécifiques du chapitre IV du titre II.

Art. 61. - Le directeur général de l'alimentation, le directeur général de la consommation, de la concurrence et de la répression des fraudes et le directeur des transports terrestres sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au Journal officiel de la République française.

Fait à Paris, le 20 juillet 1998.

Le ministre de l'agriculture et de la pêche,
Louis Le Penec
Le ministre de l'économie,
des finances et de l'industrie,
Dominique Strauss-Kahn
Le ministre de l'équipement,
des transports et du logement,
Jean-Claude Gayssot

ANNEXE I CATÉGORIES D'ALIMENTS

Catégorie 1

Produits bruts issus de récoltes et sous-produits non destinés à l'alimentation humaine en l'état tels que :

- Céréales, oléagineux protéagineux (graines et tourteaux, pulpes);
- Sons et issues;
- Pommes de terre, betteraves (industrielles et pulpes);
- Sucre brut destiné au raffinage;
- Produits de maraîchage, fruits et légumes en l'état;
- Produits horticoles, moût;
- Drêches, produits de brasserie, produits de malterie, produits de semoulerie de maïs;
- Sel.

Catégorie 2

Produits stables à température ambiante, en vrac ou conditionnés, tels que :

Aliments à l'état liquide, sous forme de granulés ou en poudre, en vrac ou conditionnés, ne nécessitant pas de maintien à température dirigée tels que :

- jus de fruits, vin, alcool, boissons autres que les eaux minérales;
- huiles végétales, matières grasses végétales;
- laits et produits à base de lait stérilisé ou stérilisés UHT, laits et produits laitiers concentrés;
- ovoproduits;
- additifs alimentaires, arômes, enzymes;
- poudres anhydres d'origine animale ou végétale;
- poudres et caséines stabilisées, poudre de lait, autres produits en poudre à base de lait;
- produits de meunerie, produits de semoulerie de blé dur;
- épices;

Conserves ou produits conditionnés stables à température ambiante tels que :

- pains;
- laits infantiles, produits à base de viande ou de poisson stabilisés par salaison, fumage, séchage;
- biscuits, viennoiseries;
- fruits secs.

Catégorie 3

Produits fragiles, altérables ou non stables à température ambiante, tels que :

a) Aliments :

- (Eufs en coquille;
- produits de la pêche (poissons, crustacés et coquillages vivants);
- toute denrée dont la conservation exige le maintien à température dirigée, notamment les produits carnés, les laits et produits laitiers, les ovoproduits et produits à base d'œufs, les levures, les produits végétaux y compris les jus de fruits et les végétaux crus découpés prêts à l'emploi, ainsi que les préparations élaborées, les sorbets et crèmes glacées;

b) Déchets animaux (carcasses ou partie d'animaux ou produits d'origine animale non destinés à la consommation humaine en l'état, à l'exclusion des déjections animales et des déchets de cuisine et de table), les denrées d'origine animale dont la limite de consommation est dépassée mais non avariées et sous réserve de l'autorisation des services vétérinaires.

ANNEXE II-1
TEMPÉRATURES MAXIMALES DES ALIMENTS CONGELÉS LORS DU TRANSPORT

État et nature	Température maximale	Catégorie, qualification et classe (1)
Congelés (2) Toutes denrées surgelées au sens du décret n°64-949 du 9 septembre 1964 modifié.	-18 °C	RRC FRC FRF
Glaces, crèmes glacées et sorbets.	-18 °C	
Produits de la pêche congelés.	-18 °C	
Autres aliments congelés, y compris pour les animaux de compagnie.	-12 °C	
Poissons entiers congelés en saumure destinés à la fabrication de conserves.	-9 °C	RRB-RRC FRB-FRC-FRE-FRF

(1) Telles que définies dans l'annexe de l'Accord sur le transport des denrées périssables publié au Journal officiel de la République française.

(2) État congelé : la température de la denrée indiquée est la température maximale sans limite inférieure.

ANNEXE II-2
TEMPÉRATURES MAXIMALES DES ALIMENTS RÉFRIGÉRÉS LORS DU TRANSPORT

État et nature	Température maximale	Catégorie, qualification et classe (1)
Produits de la pêche frais ou décongelés et produits de crustacés et de mollusques cuits réfrigérés (à l'exception des produits de la pêche et des coquillages vivants) (2).	0 °C à + 2 °C	Température de la glace fondante I (N ou R) R (N ou R) (D) F (N) (AD) F (R) (ABCD)
Viandes hachées et préparation de viandes hachées.	+ 2 °C	R (N ou R) (AD) F (N) (AD) F (R) (ABCD)
Abats et préparations de viandes en contenant.	+ 3 °C	
Autres préparations de viandes de toutes espèces, y compris la chair à saucisse et la saucisse crue.	+ 4 °C	
Viandes de volailles, lapin, rongeurs, gibier d'élevage, gibier à plumes.	+ 4 °C	
Viandes d'animaux de boucherie, viande de gibier ongulé.	+ 7 °C	
Ovoproduits à l'exception des produits UHT.	+ 4 °C	
Végétaux et préparations de végétaux crus prêts à l'emploi.	+ 4 °C	
(Œufs réfrigérés) (3)	+ 5 °C	
Lait cru livré en l'état à la consommation (4)	+ 4 °C	
Lait pasteurisé.	+ 6 °C	
Lait cru destiné à l'industrie.	+ 10 °C	I (N ou R) R (N ou R) (A) F (N) (AD) F (R) (ABCD)
Produits laitiers frais (yaourts, kéfirs, crème et fromages frais, etc.) (5). Divers produits transformés à base de viandes, plats cuisinés et préparations culinaires (viandes, poissons), produits à base de poisson (6). Divers produits à base de lait tels que crèmes pâtisseries, pâtisseries fraîches, entremets, fromages affinés. Autres denrées alimentaires.	Température définie sous la responsabilité du fabricant ou du distributeur.	R (N ou R) (AD) F (N) (AD) F (R) (ABCD)
Repas livrés en liaison froide.	0 °C à + 3 °C	R (N ou R) (D) F (N) (AD) F (R) (ABCD)
Matières premières d'origine animale destinées à la transformation pour la préparation d'aliments pour animaux de compagnie.	0 °C à + 7 °C	R (N ou R) (AD) F (N) (AD)
Produits crus ou produits finis destinés à l'alimentation des animaux de compagnie.	0 °C à + 4 °C	F (R) (ABCD)
Repas livrés en liaison chaude.	Température minimale + 63 °C	Engin non doté d'isolation thermique I (N ou R) C (A ou B)

(1) Telles que définies dans l'annexe de l'Accord sur le transport des denrées périssables publié au Journal officiel de la République française.

(2) Pour les poissons, mollusques et crustacés vivants, se reporter à l'article 31

(3) Pour les œufs en coquilles non réfrigérés, se reporter à l'article 32.

(4) Au sens de l'arrêté du 6 août 1985 relatif aux normes d'hygiène et de salubrité auxquelles doit répondre le lait cru livré en l'état et destiné à la consommation humaine;

(5) L'expression « fromage frais » s'entend des fromages non affinés (dont la maturation n'est pas achevée), prêts à être consommés peu de temps après leur fabrication et qui ont une durée de conservation limitée.

(6) À l'expression des produits stabilisés par chauffage, fumaison, salage, marinage, saieison ou dessiccation, ou une combinaison de ces différents procédés, lorsque leur mode de conservation défini sous la responsabilité du fabricant ou du conditionneur ne requiert pas une température dirigée.

Nota. - Lorsque la température extérieure nécessite la mise hors gel des denrées, les équipements thermiques calorifiques peuvent être utilisés pour permettre le respect des températures de la présente annexe.

CHAPITRE X

PRODUITS DE NETTOYAGE ET DE DÉSINFECTION

Selon la norme AFNOR (NF T 72101), la désinfection est « une opération au résultat momentané permettant d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus indésirables, sur des milieux inertes, en fonction des objectifs fixés ».

Les désinfectants chimiques sont le plus fréquemment employés. Le but du nettoyage est, en éliminant les salissures par une action mécanique, puis par celle de substances chimiques, de priver les micro-organismes de tout substrat organique pouvant favoriser leur développement. Nettoyage et désinfection sont donc complémentaires : aucune désinfection n'est possible si elle n'a été précédée d'un nettoyage efficace. La plupart des substances utilisées pour le nettoyage sont des détergents, car les salissures sont souvent de nature grasseuse (mais aussi parce que les salissures d'autre nature sont plus ou moins aisément éliminées par l'eau). De façon générale, on utilise un dégraissant à pH neutre pour les souillures fraîches (vaisselle, petit matériel, table de travail), alcalin pour les salissures sèches ou cuites (sols), très alcalin pour les souillures carbonisées (nettoyage des fours).

1. Classification et propriétés des désinfectants

Les plus utilisés appartiennent à six groupes importants :

- les composés halogénés qui comprennent le chlore et les composés chlorés, l'iode et les composés iodés ;
- les aldéhydes comme le formol (formaldéhyde ou méthanal) et le glutaraldéhyde ;
- les oxydants tels l'ozone ou l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) ;
- les ammoniums quaternaires qui ont des propriétés détergentes ;
- les alcools ;
- les phénols. Les monophénols comme l'acide phénique, le crésol, le chlorocrésol sont de bons désinfectants des sols et des installations sanitaires.

	Bactéries à Gram		Mycobactéries	Spores	Champignons	Virus
	positif	négatif				
Alcool à 70°	++	++	0	+	+	+
Aldéhydes	+++	+++	++	+	+++	++
Ammoniums quaternaires	+++	+ inactifs sur les <i>Pseudomonas</i>	0	0	+	+
Carbanilides	+	0			0	
Chlorhexidine	+++	++	0	0	+	0
Chlore	+++	+++	++	++	++	++
Hexachlorophène	+++	+	0	0	+	0
Iode	+++	+++	++	++	++	++
Dérivés mercuriels	++	++	0	0	+	
Phénoliques	Activité variable selon les composés					

Tableau 1 – Spectre d'activité des antiseptiques et des désinfectants

Un bon désinfectant possède tout ou partie des qualités suivantes :

- il a une action persistante (rémanence) ;
- il a un spectre d'activité le plus large possible ;
- il agit à faibles doses ;
- il est sans action corrosive sur le matériel ;
- il ne laisse pas de résidus après le rinçage ;
- les bactéries ne s'y adaptent pas (pas de phénomène de résistance).

	Inactivation Incompatibilités d'emploi	Accidents
Alcool	matières organiques	
Aldéhydes (glutaraldéhyde)	matières organiques solution instable	irritants
Ammoniums quaternaires	matières organiques détergents anioniques eaux dures polysorbates, phospholipides	hypersensibilisation cutanée et muqueuse
Carbanilides		photosensibilisation production d'aniline par chauffage du trichlorocarbanilide (méthémoglobinémie du nouveau-né)
Chlore	matières organiques	corrosion des métaux irritant
Chlorhexidine	matières organiques et liège détergents anioniques	hypersensibilisation cutanée
Iode	matières organiques	irritant
Dérivés mercuriels	matières organiques plastiques et caoutchouc	toxicité tissulaire par accumulation dermite par sensibilisation
Phénoliques	matières organiques plastiques et caoutchouc (adsorption)	irritants toxicité nerveuse (hexachlorophène)

Tableau 2 – Désinfectants : incompatibilités et risques toxicologiques
(d'après J. Fleurette in la Revue du Praticien, 1980)

2. Mode d'action

La plupart des désinfectants agissent sur les structures vitales des micro-organismes, en particulier sur la membrane cytoplasmique. Rappelons que cette formation assure des fonctions essentielles à la vie des bactéries : production d'énergie, transport actif de nutriments. D'autres structures peuvent être affectées par l'action des propriétés détergentes qui provoquent des changements importants dans l'ultrastructure de la membrane cytoplasmique, celle-ci devenant incapable d'assurer ses fonctions (rappelons qu'elle est riche en lipides qui sont la cible des détergents).

Le pouvoir oxydant apparaît déterminant. En effet, il a été prouvé expérimentalement que l'activité des désinfectants dépend en premier lieu de leur potentiel d'oxydoréduction.

Celui-ci décroît, dans l'eau, dans l'ordre suivant :

ozone → eau oxygénée → hypobromite → hypochlorite → hypoiodite → chlore → brome → chloramine → iode.

Deux autres paramètres déterminent l'activité d'un désinfectant :

- sa charge électrique qui conditionne son affinité pour les structures microbiennes ;
- son pouvoir de diffusion dans l'organisme, qui détermine le nombre de molécules parvenant au site d'action.

Les composés chlorés se dissocient dans l'eau selon les équations suivantes :



L'acide hypochloreux est actif sur les membranes, l'ion ClO^- agit d'autre part en produisant de l'oxygène actif particulièrement réactif. Les oxydants agissent aussi en libérant de l'oxygène actif.

3. Liste des produits autorisés

MINISTÈRE DE L'ÉCONOMIE, DES FINANCES ET DE L'INDUSTRIE

Arrêté du 8 septembre 1999 pris pour l'application de l'article 11 du décret n° 73-138 du 12 février 1973 modifié portant application de la loi du 1er août 1905 sur les fraudes et falsifications en ce qui concerne les procédés et les produits utilisés pour le nettoyage des matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées, produits et boissons pour l'alimentation de l'homme et des animaux

NOR : ECOC9900090A

Le ministre de l'agriculture et de la pêche, la secrétaire d'Etat à la santé et à l'action sociale, la secrétaire d'Etat aux petites et moyennes entreprises, au commerce et à l'artisanat et le secrétaire d'Etat à l'industrie,

Vu le code de la consommation, notamment son article L. 214-1 ;

Vu le décret n° 73-138 du 12 février 1973 modifié portant application de la loi du 1^{er} août 1905 sur les fraudes et falsifications en ce qui concerne les procédés et les produits utilisés pour le nettoyage des matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées, produits et boissons pour l'alimentation de l'homme et des animaux ;

Vu la lettre parvenue le 9 février 1999 à la Commission des Communautés européennes par laquelle le Gouvernement français a saisi ladite Commission, selon la procédure prévue par la directive 98/34/CE du 22 juin 1998 ;

Vu l'avis du Conseil supérieur d'hygiène publique de France du 7 juillet 1998,

Arrêtent.

Art. 1^{er}. - Les constituants autorisés dans les produits de nettoyage des matériaux et objets destinés à être mis au contact des denrées alimentaires en application des dispositions prévues par l'article 11 du décret du 12 février 1973 modifié susvisé sont inscrits dans la liste figurant en annexe du présent arrêté.

Ces constituants ou groupes de constituants sont, le cas échéant, accompagnés :

- de leurs critères de pureté ;
- de leurs concentrations maximales et minimales dans les produits de nettoyage ;
- de leurs conditions d'utilisation.

Art. 2. - La concentration en constituants des produits destinés au rinçage de la vaisselle doit être telle que le bain de rinçage, obtenu en respectant le mode d'emploi se rapportant à ces produits de rinçage, ne contienne pas plus de 200 mg de constituants par litre de préparation aqueuse destinée à être mise directement au contact de la vaisselle.

Art. 3. - L'arrêté du 27 octobre 1975 modifié relatif aux produits de nettoyage du matériel pouvant se trouver au contact des denrées alimentaires est abrogé.

Art. 4. - Le directeur général de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, la directrice générale de l'alimentation, le directeur général de la santé et la directrice générale de l'industrie, des technologies de l'information et des postes sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au Journal officiel de la République française.

Fait à Paris, le 8 septembre 1999.

Le ministre de l'agriculture et de la pêche,
Pour le ministre et par délégation :
Par empêchement de la directrice générale
de l'alimentation :
L'administrateur civil hors classe,
J.-J. Renault

ANNEXE

LISTE DE CONSTITUANTS AUTORISÉS DANS DES PRODUITS DE NETTOYAGE DE MATÉRIEAUX ENTRANT AU CONTACT D'ALIMENTS

SECTION I a

Constituants autorisés, autres que ceux mentionnés aux sections 3 et 4, pour entrer dans la composition de produits de nettoyage présentés comme étant destinés à des utilisations industrielles, lorsque ces produits de nettoyage soit doivent être rincés à l'eau potable, ou à la vapeur d'eau, après usage, soit sont présentés comme servant au rinçage de la vaisselle

On entend par « sels alcalins », ou « alcalins », au sens des dispositions applicables aux constituants ainsi qualifiés appartenant à la présente section, tous les sels de sodium, de potassium, d'ammonium et d'alcanolamines.

Les constituants de la présente section ne doivent pas communiquer aux produits de nettoyage commercialisés des caractéristiques dangereuses du point de vue toxicologique du fait de leurs concentrations en éléments chimiques contaminants. En particulier les critères de pureté généraux suivants sont applicables à ceux de ces constituants qui sont signalés comme devant répondre aux dispositions applicables à des additifs alimentaires :

- arsenic : pas plus de 3 mg/kg ;
- plomb : pas plus de 10 mg/kg ;
- zinc et cuivre : pas plus de 50 mg/kg, dont 25 mg de zinc.

1. Premier groupe

Constituants du type « agents de surface »

A. - Agents de surface anioniques

1. Savons (sels alcalins d'acides gras et résiniques).
2. Alkylsulfates alcalins.
3. Alkylsulfonates alcalins.
4. Alkylarylsulfonates alcalins.
5. Dioctyl-sulfosuccinate de sodium.
6. Sels de sodium de sulfonates d'alpha-oléfines.

Les constituants commercialisés, comportant au moins 38 % de matières actives anioniques en solution aqueuse, ne doivent pas contenir plus de 2 % d'alpha-oléfine libre, plus de 1 % de sulfate de sodium, plus de 1 % de chlorure de sodium, plus de 300 milligrammes de sulfones totales par kilogramme et plus de 50 milligrammes de 1,4-sultone par kilogramme.

7. Alkylaryl polyglycol éther sulfonates alcalins.

Ces constituants correspondent au produit de la combinaison des alkylarylsulfonates alcalins, des alcools gras polyéthoxylés et des sels alcalins des dérivés sulfatés de ces alcools gras polyéthoxylés.

8. Acides mono et dialkyl-diphényloxyde-disulfoniques et leurs sels alcalins.

Ces agents de surface comportent des radicaux alkyles constitués par des chaînes linéaires de neuf à dix atomes de carbone.

Ils ne contiennent pas d'autres solvants que le chlorure de méthylène à la teneur maximale pondérale de 1 %.

B. - Agents de surface cationiques

Sels d'ammonium quaternaire mentionnés ci-dessous

Il est convenu que, pour les sels d'ammonium quaternaire mentionnés ci-dessous, le radical « aryle » ou « Ar » correspond au groupement phényle (C₆H₅-) ou au groupement benzyle (C₆H₅-CH₂-) et que le radical « alkyle » ou « R » correspond à une chaîne hydrocarbonée saturée, droite ou ramifiée, comportant de huit à dix-huit atomes de carbone compris.

L'utilisation d'un sel d'ammonium quaternaire comme constituant d'un produit de nettoyage est subordonnée au contrôle de l'efficacité du rinçage de ce produit à l'aide d'un réactif approprié.

Sauf dispositions particulières, l'emploi de sels d'ammonium quaternaire est autorisé pour toutes les destinations, y compris les industries utilisatrices de lait comme celles des crèmes glacées, ou des pâtisseries, ou des confiseries, à l'exception des laiteries, ou du matériel de laiterie, et des industries de la fermentation du lait.

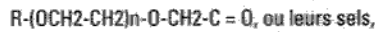
1. Chlorures ou bromures de triméthyl alkyl ammonium ;
2. Chlorures ou bromures de diméthyl dialkyl ammonium ;
3. Chlorures ou bromures de méthyl trialkyl ammonium ;
4. Chlorures ou bromures de diméthyl aryl alkyl ammonium ;
5. Chlorures ou bromures de diméthyl alkyl éthylaryl ammonium ;
6. Chlorures ou bromures de méthyl aryl dialkyl ammonium ;
7. Chlorures ou bromures d'aryl trialkyl ammonium ;
8. Chlorures ou bromures de méthyl diaryl alkyl ammonium ;
9. Chlorures ou bromures de diaryl dialkyl ammonium ;
10. Chlorures ou bromures de diméthyl aryl alkyl phénoxy (ou crésoxy) éthoxy éthyl ammonium ;
11. Chlorures ou bromures d'alkyl imidazolium ;
12. Chlorures d'alkyl pyridinium ;
13. Chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium.

Contrairement aux dispositions générales précitées, ce constituant est utilisable pour toute destination, y compris pour les laiteries ou le matériel de laiterie et les industries de la fermentation du lait.

C. - Agents de surface non ioniques

1. Acides gras et résiniques polyéthoxylés.
2. Alcools gras polyéthoxylés et les sels alcalins de leurs dérivés sulfatés, ainsi que les dérivés carboxylés, ou leurs sels alcalins, de ces alcools gras polyéthoxylés. Les sels alcalins de ces substances sont à ranger dans la catégorie des agents de surface anioniques.

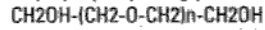
Les dérivés carboxylés des alcools gras polyéthoxylés, ou leurs sels, répondent à la formule suivante :



I
OH

dans laquelle R correspond à une chaîne linéaire dont le nombre d'atomes de carbone est compris entre 4 inclus à 22 inclus et n 2.

Le polyoxyéthylène glycol de formule :



dans laquelle n correspond à environ 225, est assimilé aux alcools gras polyéthoxylés.

L'hexylglucoside de formule : $RO-(C_6O_5H_{10})_n-C_6O_5H_{11}$, avec n = 1 à 5 et R = 6 atomes de carbone, est assimilée aux alcools gras polyéthoxylés précités.

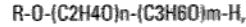
3. Dérivés carboxylés d'alkylphénols polyéthoxylés, ou leurs sels alcalins.

4. Alkylphénols polyéthoxylés, les sels alcalins de leurs dérivés sulfatés et leurs éthers benzyls.

Les sels alcalins de ces substances sont à ranger dans la catégorie des agents de surface anioniques.

5. Copolymères d'alkyl-éthers et d'oxydes d'éthylène et de propylène.

Ces constituants doivent répondre à la formule suivante :



ou encore :



I
CH₃

dans laquelle R est un radical hydrocarboné de huit à dix-huit atomes de carbone ; n varie de 1 à 17 et m de 2 à 16.

Lesdits constituants peuvent également être désignés comme étant des « copolymères d'alcools et d'oxydes d'éthylène et de propylène ». Les constituants commercialisés doivent contenir plus de 99 % de copolymères d'alkyl-éther et d'oxydes d'éthylène et de propylène autorisés. En particulier leur teneur maximale résiduelle en oxyde d'éthylène monomère ne doit pas dépasser 5 milligrammes par kilogramme.

6. Propylèneglycols polyéthoxylés.
7. Lanoline polyéthoxylée.
8. Sucroglycéride de suif oxyéthyléné.

9. Alcanolamides d'acides gras.

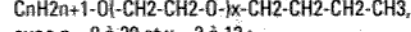
10. Esters d'acides gras de saccharose et sucroglycérides :

- 10.1. Mono et di-stéarates de saccharose ;
- 10.2. Mono et di-palmitates de saccharose ;
- 10.3. Mono et di-oléates de saccharose ;
- 10.4. Sucroglycérides des acides gras et des corps gras alimentaires.
11. Oxyde de dodécyl-diméthyl-amine.

12. Monolaurate de polyoxyéthylène 20 sorbitane, ou polysorbate 20.

13. Ethoxylats d'alcools gras bloqués en bout de chaîne par un radical butyle.

Ces agents de surface répondent à la formule suivante :



avec n = 8 à 20 et x = 2 à 12 ;

14. Caprylil capryl glucoside.

Ces agents de surface répondent à la formule suivante :



avec n = 1 à 5 et R = chaîne hydrocarbonée de huit à dix atomes de carbone.

Leurs poids moléculaires est d'environ 700. La concentration pondérale de ces agents de surface en alcool décylsique n'excède pas 2 %.

15. Esters de polyol-polyéthoxylés.

Ces constituants comportent un radical $(-CH_2-CH_2-O)_n$ dans lequel n est généralement compris entre 20 et 200. Le polyol, de ces esters de polyol-polyéthoxylés, est une chaîne carbonée courte de l'un des types suivants : éthylène glycol, propylène glycol, glycérol et méthylglucose. Les esters de ces mêmes polyol-polyéthoxylés comportent une chaîne grasse de six à vingt-deux atomes de carbone saturée ou non. La teneur maximale de ces constituants en oxyde d'éthylène libre est de 1 milligramme par kilogramme.

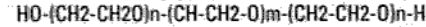
16. Condensats d'alcools oxo avec des molécules d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de butylène.

Ces constituants, présentés ou non en solution aqueuse, correspondent à des condensats d'alcools oxo, de C9 à C15, avec jusqu'à treize molécules d'oxyde d'éthylène et jusqu'à quatre molécules d'oxyde de butylène, les groupes terminaux de ces condensats étant bloqués ou non par des groupes méthyles.

17. Alkylglucosides.

18. Copolymères d'oxydes d'éthylène et de propylène.

Ce constituant répond à la formule générale :



I
CH₃

19. Alkylglucosamides dérivés d'acides gras en C12-C14.

Ces agents de surface non ioniques se présentent sous la forme de deux produits, commercialisés en solutions hydroalcooliques à 40 % ou 50 %, qui diffèrent par les proportions respectives d'acides laurique et myristique.

Les solutions commercialisées répondent aux caractéristiques suivantes :

C12 GLUCOSAMIDE

C12-C14 GLUCOSAMIDE

20. 2-éthylhexylglucoside.

21. Sel de sodium du mélange de monoéthanol amides d'acide gras polyéthoxylé et carboxylé.

Il contient au maximum 1 milligramme par kilogramme de dioxane, 20 milligrammes par kilogramme d'acide monochloracétique et une concentration en oxyde d'éthylène libre non détectable à l'aide d'une méthode usuellement employée.

Ce constituant peut être utilisé à la concentration maximale de 7 % dans les formulations de nettoyage mises en vente.

22. Alcools alcooxylés.

Il rassemble des agents de surface obtenus à partir : d'une mole du mélange d'alcools linéaires acycliques C6 à C12, d'une mole d'oxyde de propylène, de dix à vingt-cinq moles d'oxyde d'éthylène et d'une mole de 1,2 époxyalcane dont la chaîne varie de C4 à C12. Le taux d'impuretés de ces substances est inférieur à 1 %.

Il est utilisable dans des formulations de nettoyage mises en vente, à des concentrations n'excédant pas 5 %.

D. - Agents de surface amphotères (ou ampholytes)

1. 1-alkyl-amido-3-diméthylammonio-propano-3-carboxy-méthyl- bétaine.

Ce constituant est également désigné sous le terme « cocamido-propylbétaine ».

Il est employé dans des préparations à la concentration pondérale maximale de 2,5 %.

Cette concentration peut toutefois être portée à 5 %, à condition que les préparations contenant ledit constituant soient réservées au lavage manuel de la vaisselle industrielle.

2. Alkyl-diméthyl-bétaïnes.

Ces agents de surface amphotères

Ils se présentent sous la forme de solutions, à environ 30 % de matière active, qui répondent aux spécifications suivantes :

Pureté de la bétaine... supérieure à 90 % en poids ;

Chlorure de sodium... 7,2 % en poids ;

Amine libre... inférieure à 1 % en poids ;

Acide glycolique... inférieur à 1 % en poids ;

Acide monochloroacétique... inférieur à 0,4 % en poids.

Ils sont utilisables à la concentration maximale de 5 %, dans les préparations destinées au nettoyage manuel de la vaisselle industrielle.

2. Deuxième groupe

Constituants du type « désinfectants » ou « conservateurs »

1. Eau oxygénée.

2. Acide peracétique.

L'acide acétique utilisé pour l'obtention d'acide peracétique doit avoir un degré de pureté supérieur à 99,5 %.

L'utilisation d'acide peracétique (CH₃-CO₃H) est subordonnée à l'inscription d'une date limite d'utilisation sur les emballages des préparations contenant ladite substance.

3. Hypochlorites alcalins.

4. Acides chlorocyanuriques et leurs sels de sodium.

5. Chlorure de chaux.

6. Dichloroglycoluril.

7. Paratoluène chlorosulfamide sodée.

8. Acide hydroxyacétique.

9. Alcool éthylique.

Cet alcool peut éventuellement être dénaturé par l'acétate d'amyle ou l'acétate d'éthyle additionné de méthyl-éthylcétone.

10. Alcool isopropylique.

Cet alcool peut éventuellement être dénaturé par l'acétate d'amyle ou l'acétate d'éthyle additionné de méthyl-éthylcétone. L'alcool isopropylique peut également être éventuellement dénaturé par 0,5 % en volume de méthyl-éthylcétone.

11. Butylglycol.

12. Aldéhyde formique.

Cette substance est utilisable en solutions aqueuses.

13. Glutaraldéhyde.

Cette substance, qui a pour formule :

CHO-CH₂-CH₂-CH₂-CHO, est utilisable dans des solutions aqueuses.

14. Iodophores mentionnés ci-dessous :

Ces iodophores ne peuvent être employés que si la quantité d'iode actif ne dépasse pas 1 % dans la préparation mise en vente. L'utilisation d'un iodophore comme constituant d'un produit de nettoyage est subordonnée au contrôle de l'efficacité du rinçage de ce produit à l'aide d'un réactif approprié.

14.1. Complexe iodé du polyéthoxypolypropoxy-polyéthoxyéthanol ;

14.2. Complexe iodé du nonylphénoxy-polyéthoxyéthanol ;

14.3. Complexe iodé du tri-isopropanolamine-polyoxypropylénée.

15. 3,5,4'-tribromosalicylanilide.

16. Bromure de potassium.

Cette substance ne peut être employée qu'à une dose inférieure à 3 % en poids dans la préparation mise en vente.

Le bromure de potassium peut être associé au permanganate de potassium, à condition que la quantité de permanganate de potassium ne

dépasse pas 1 % de la quantité de bromure de potassium.

17. Permanganate de potassium.

Cette substance ne peut être employée que dans la proportion maximum de 1 % du produit de nettoyage tel que mis en vente. Il faut en outre que son emploi soit suivi d'un rinçage à l'eau, puis d'un traitement par une solution aqueuse d'anhydride sulfureux ou de bisulfite alcalin acidifiée à l'acide chlorhydrique et, enfin, d'un rinçage abondant.

18. Chlorhydrate de poly-(hexaméthylènebiguanide).

A utiliser en solutions aqueuses à 20 %.

19. Chlorhydrate de décyl-3-hydroxy-2-amino-1-propane.

La formule brute de cette substance est la suivante :

C₁₀H₂₁-OCH₂-CHOH-CH₂-NH₂-HCl.

Cette substance est obtenue à 95 % de pureté environ. Elle doit répondre aux critères ci-dessous :

Décanol... moins de 0,1 % en poids ;

Décyl-3-chloro-1-propanol-2... moins de 0,2 % en poids ;

Décyl-3-propanediol-1,2... moins de 0,2 % en poids ;

Traces éventuelles de dérivés phtaliques : inférieures ou égales à 50 milligrammes par kilogramme.

20. Acide lauryl-diéthylène-triamino-acétique.

Au radical lauryle (dodécyl) de ce constituant peut être substitué un radical alkyle comportant au moins deux tiers en radical lauryle C₁₂H₂₅ et le reste en radical myristique C₁₄H₂₉.

21. Acide lauryl-propylène-diamino-acétique.

Au radical lauryle (dodécyl) de ce constituant peut être substitué un radical alkyle comportant au moins deux tiers en radical lauryle C₁₂H₂₅ et le reste en radical myristique C₁₄H₂₉.

22. Lauryl-diéthylène-triamine.

Au radical lauryle (dodécyl) de ce constituant peut être substitué un radical alkyle comportant au moins deux tiers en radical lauryle C₁₂H₂₅ et le reste en radical myristique C₁₄H₂₉.

23. Lauryl-propylène-diamine.

Au radical lauryle (dodécyl) de ce constituant peut être substitué un radical alkyle comportant au moins deux tiers en radical lauryle C₁₂H₂₅ et le reste en radical myristique C₁₄H₂₉.

24. Dioctyl-diéthylène-triamine.

25. Trioctyl-diéthylène-triamine.

26. Chlorure d'iode.

La concentration maximale pondérale en chlorure d'iode des préparations ne doit pas excéder 1,5 %.

27. Acide sorbique.

Cet acide, pur à 99 % minimum en poids, répond aux caractéristiques de pureté de l'additif alimentaire E 200.

Il est utilisable à la concentration maximale pondérale de 3 % dans des solutions hydroalcooliques, elles-mêmes employées par trempage.

28. Acide octylphosphonique.

Ce constituant, dit aussi acide octane-1-phosphonique, est utilisable à la concentration maximale pondérale de 5 %.

29. Di-(aminopropyl)-laurylamine.

Ce constituant, dit également N,N-bis-3-aminopropyl-laurylamine, est accompagné des produits de sa polymérisation, de laurylamine et de laurylpropylène-diamine, l'ensemble de ces matières étant en proportion inférieure à 2,5 % par rapport à la substance principale, la di-(aminopropyl)-laurylamine.

30. Acide hydroxy-acétique.

L'acide hydroxy-acétique, dit également « acide glycolique », répond aux caractéristiques suivantes :

IMPURETES

TENEURS MAXIMALES

Acide méthoxyacétique... 3 % en poids ;

Acide diglycolique... 1,5 % en poids ;

Acide formique... 0,45 % en poids ;

Total métaux lourds... 4 mg/kg.

31. Acide monobromoacétique.

L'acide monobromoacétique utilisé est au moins pur à 98 %. Sa teneur cumulée en acide dibromoacétique et en acide bromhydrique est inférieure ou égale à 2 %.

Il est utilisable dans les conditions suivantes :

La concentration en acide monobromoacétique de la solution désinfectante prête à l'emploi ne dépasse pas 0,7 gramme par litre. Les

préparations contenant ce constituant sont réservées aux industries des boissons (lait exclus) et sont utilisées sur des surfaces préalablement nettoyées. Leur emploi, après un temps de contact d'au moins 30 minutes, est suivi par un rinçage complet à l'eau potable, selon une procédure écrite adaptée aux conditions de chaque unité utilisatrice, l'efficacité de cette procédure de rinçage devant être vérifiée par une méthode d'analyse appropriée. La concentration en acide monobromoacétique dans la dernière eau de rinçage est inférieure à 10 microgrammes par litre pour que l'efficacité du rinçage soit considérée comme suffisante. Les préparations désinfectantes contenant de l'acide monobromoacétique comportent, sur une étiquette ou une notice, une mention rappelant la nécessité d'un rinçage dont la procédure écrite a été vérifiée par une méthode appropriée et une mention rappelant que la dernière eau de rinçage ne doit pas contenir plus de 10 microgrammes par litre de cet acide.

32. Acide salicylique.

Autres désignations : acide ortho-hydroxybenzoïque, acide hydroxy-2 benzoïque.

3. Troisième groupe
Constituants « divers »

A. - Acides (effet désincrustant et détartrant)

1. Acide sulfurique.

Cette substance ne peut être employée qu'à condition que sa teneur dans les préparations mises en vente soit inférieure à 50 %.

2. Acide chlorhydrique.

3. Acide nitrique.

4. Acide orthophosphorique.

5. Acide acétique.

6. Acide lactique.

7. Acide citrique.

8. Acide tartrique.

9. Acide sulfamique.

10. Acides alkylsulfoniques et alkylarylsulfoniques.

11. Acide adipique.

Cet acide répond aux caractéristiques de pureté de l'additif alimentaire E 355.

12. Acide succinique.

Cet acide répond aux caractéristiques de pureté de l'additif alimentaire E 363.

Cet acide présente les spécifications pondérales suivantes : teneur en métaux lourds inférieure ou égale à 10 milligrammes par kilogramme, teneur en matières insolubles dans l'eau inférieure ou égale à 100 milligrammes par kilogramme, perte à l'étuve 1 % au maximum à 105 °C pendant deux heures, titre 99 à 103 % sur matière sèche (le titre pouvant dépasser 100 du fait de la présence possible d'anhydride succinique).

13. Acide maléique.

Cet acide contient moins de 1 % d'acide fumarique lorsqu'il est présenté sous la forme d'une solution comportant 60 % d'eau.

Il est utilisé à la concentration maximale de 8 % dans les produits commercialisés.

B. - Bases

1. Soude caustique.

2. Potasse caustique.

3. Chaux.

4. Ammoniaque.

5. Alcanolamines.

C. - Sels minéraux solubles

1. Carbonates alcalins.

2. Carbonate de magnésium.

3. Bicarbonates alcalins.

4. Percarbonates alcalins.

5. Perborate de sodium.

6. Phosphates alcalins.

7. Phosphate trisodique chloré.

Le phosphate trisodique chloré est obtenu par cristallisation simultanée de ses composants : phosphate trisodique et hypochlorite de sodium.

8. Sulfates alcalins.

9. Sulfate d'aluminium.

Il s'agit du sulfate d'aluminium hydraté à 18 molécules d'eau. Les critères de pureté sont ceux du sulfate d'aluminium utilisé comme additif alimentaire.

10. Sulfate de magnésium.

11. Bisulfates alcalins.

12. Bisulfites alcalins (anhydride sulfureux).

L'emploi de ces constituants est admis uniquement dans les industries mettant en oeuvre des denrées alimentaires où la présence de telles substances est autorisée.

13. Silicates alcalins.

14. Silico aluminat de sodium.

15. Chlorures alcalins.

16. Chlorure d'aluminium.

17. Citrates d'ammonium.

D. - Charges et adjuvants insolubles

1. Carbonate de calcium.

2. Ponce.

3. Silice pulvérulente, kieselguhr et autres substances inertes.

E. - Séquestrants

1. Polyphosphates alcalins.

2. Gluconates alcalins.

3. Glucoheptonates alcalins.

4. Acide éthylène diaminotétracétique (EDTA) et ses sels alcalins.

5. Acide hydroxyéthylène diphosphonique (HEDP).

6. Acide amino-tris méthylène phosphonique.

Cet acide, dont la formule est : $N(CH_2-PO_3H_2)_3$, est aussi désigné sous le terme de « acide nitrilotriméthylène-phosphonique ».

En raison du mode de fabrication de cette substance, son emploi peut conduire à la présence d'une teneur pondérale maximale de 3 % d'acide hydroxyméthylène phosphonique, de 6 % d'acide diéthylène-triamine-tris (méthylène-phosphonique) et de 4 % d'acide phosphoreux, dans les produits de nettoyage.

7. Acide phosphono-3-carboxyhexane-dioïque.

8. Acides polyacryliques et polyacrylates de sodium.

Ces constituants sont des polymères de l'acide acrylique ou des polymères d'acrylate de sodium, de formule :

Leur masse molaire est comprise entre 1 000 grammes et 10 000 grammes.

La teneur en acide acrylique monomère ou en acrylate de sodium monomère dans ces polymères ne dépasse pas 0,2 % en poids.

9. Acide diéthylène triamine-penta-(méthylène-phosphonique).

En raison du mode de fabrication de ce constituant, son emploi peut conduire à la présence d'une teneur pondérale maximale de 3 % d'acide hydroxyméthylène phosphonique, de 6 % d'acide diéthylène-triamine-tris-(méthylène-phosphonique) et de 4 % d'acide phosphoreux, dans les produits de nettoyage.

10. Polyacide phosphinato-carboxylique.

Ce constituant correspond à une solution aqueuse contenant 71 % à 79 % de bis-(poly-2-carboxy-éthyl)-phosphinate de sodium.

Il contient 9 % de phosphonites, 8 % d'acide hypophosphoreux, 2 % d'acide bis-2-carboxy-éthyl-phosphonique, 1 % de phosphonates, 1 % d'acide phosphoreux et 0,01 % d'acide acrylique.

11. Copolymères d'acide acrylique et d'acide maléique.

Ces copolymères ont une teneur totale en monomères de l'acide maléique et de l'acide fumarique inférieure ou égale à 0,4 % et une teneur en monomère de l'acide acrylique inférieure ou égale à 0,01 %.

Ils ont un poids moléculaire moyen compris entre 50 000 et 70 000 et sont constitués par :

- le sel de sodium d'un copolymère d'acide acrylique et d'acide maléique dans le rapport pondéral de 7 à 3 ;
- le même copolymère que le précédent mais partiellement neutralisé par la soude ;
- le sel de sodium d'un copolymère d'acide acrylique et d'acide maléique dans le rapport pondéral de 1 à 1.

F. - Agents antimousse, antiredéposition ou épaississants**1. Méthylpolysiloxanes.**

2. Méthylcellulose, carboxyméthylcellulose, éthylcellulose et hydroxyéthylcellulose.

3. Gomme xanthane.

Ce constituant répond aux caractéristiques de pureté de l'additif alimentaire E 415.

Il peut être utilisé dans des produits de nettoyage à la dose maximale de 0,5 %.

4. Alginates, pectines et carraghénanes.**5. Phosphate acide de stéaryle.**

Cette dénomination recouvre un mélange de 78 % du monoester et de 22 % du diester phosphorique de l'acide stéarique.

L'emploi du phosphate acide de stéaryle n'est admis qu'à la dose maximum de 15 milligrammes par litre d'eau de lavage.

6. Polyvinylpyrrolidone.

Ce constituant répond aux caractéristiques de pureté de l'additif alimentaire E 1201.

Il peut aussi être employé dans des solutions hydroalcooliques contenant au plus 3 % d'acide sorbique. Dans ce cas, la proportion en polyvinylpyrrolidone desdites solutions ne doit pas être plus forte que celle strictement nécessaire à l'effet recherché.

7. Copolymères acryliques.

Ces copolymères acryliques sont présentés en émulsions aqueuses. Ils sont constitués d'acide méthacrylique, d'acrylate d'éthyle, jusqu'à 3 % d'éthoxy) 20 méthacrylate de cétyle-stéaryle, jusqu'à 0,5 % d'éthoxy) 20 méthacrylate de lauryle et d'eau. Leur poids moléculaire est d'environ 500 000.

Les teneurs en monomères de ces constituants sont respectivement inférieures à 500 milligrammes par kilogramme pour l'acrylate d'éthyle et à 100 milligrammes par kilogramme pour l'acide méthacrylique.

8. Polymères de l'acide acrylique réticulés par un poly-alcényl-poly-éther.

Ces polymères doivent être préparés en l'absence d'hydrocarbures benzéniques et de solvants chlorés, à l'exception du dichlorométhane dont la concentration résiduelle ne doit pas excéder 500 milligrammes par kilogramme. Ils ont des teneurs en acide acrylique monomère et en acétate d'éthyle respectivement inférieures à 3 grammes par kilogramme et à 10 grammes par kilogramme. Leur teneur en cyclohexane est inférieure à 2 grammes par kilogramme. Ces polymères ont un poids moléculaire moyen voisin de 1 500 000.

Ils sont utilisables dans des préparations à la concentration pondérale maximale de 3 %. Les quantités mises en oeuvre doivent être juste nécessaires pour obtenir l'effet technologique recherché.

9. Formiate de sodium.

Ce constituant répond aux caractéristiques de pureté de l'additif alimentaire E 237.

10. Hydroxypropyl cellulose.

Ce constituant répond aux caractéristiques de pureté de l'additif alimentaire E 463.

11. Distéarate d'éthylène-glycol.

Ce constituant, comportant 1 % au maximum d'éthylène-glycol, est constitué de 85 à 95 % de diester R-COO-CH₂-CH₂-OOC-R et de 5 à 15 % de monoester R-COO-CH₂-CH₂-OH, pour lesquels R-COO correspond à un mélange d'acides gras saturés en C16 et C18.

Il est utilisable à la dose maximale de 2 % dans les produits destinés au lavage manuel de la vaisselle industrielle.

G. - Solvants**1. Monométhyléther du propylène glycol et monométhyléther du dipropylène glycol.**

Ces constituants présentent un taux d'impureté inférieur ou égal à 1 %. Ils ne contiennent pas plus de 0,25 % d'eau et leurs teneurs en métaux lourds sont inférieures à 0,4 milligramme par kilogramme pour le cad-

mium, le cuivre, le mercure et l'arsenic, et inférieures à 0,8 milligramme par kilogramme pour le plomb.

2. Propylène glycol n-butyl éther.

Ce constituant contient plus de 99 % de n-butoxypropanol, dont moins de 5 % sont constitués de 2-n-butoxypropanol-1. Il est constitué par deux isomères de l'éther n-butylque du propylène glycol et contient plus de 95 % de 1-n-butoxy-propanol-2.

Il est utilisable dans les préparations à la concentration maximale pondérale de 10 %.

3. Dipropylène glycol n-butyl éther.

Ce constituant contient plus de 98,5 % de n-butoxypropoxypropanol, dont environ 4 % sont constitués de 1-(2-n-butoxypropoxy)-propanol-2 et dont une très faible proportion est constituée de 2-(2-n-butoxypropoxy)-propanol-1 et de 2-(2-n-butoxy-1-méthyl-éthoxy)-propanol-1. Il comporte quatre isomères de l'éther n-butylque du dipropylène glycol et contient plus de 95 % de 1-(2-n-butoxy-1-méthyl-éthoxy)-propanol-2.

Il est utilisable dans les préparations à la concentration maximale pondérale de 10 %.

4. Butyldiglycol ou monobutyléther du diéthylène glycol.

Ce constituant respecte les critères suivants :

- Pureté ... 98 % en poids minimum ;
- Teneur en diglycol ... inférieure à 0,2 % en poids ;
- Teneur en glycol ... inférieure à 0,1 % en poids ;
- Teneur en eau ... inférieure à 0,1 % en poids.

5. Triéthylène glycol.

Ce constituant présente une pureté supérieure à 99,6 % et respecte les critères suivants :

- Tétraéthylène glycol ... inférieure à 2 % en poids ;
- Diéthylène glycol ... inférieur à 1 % en poids ;
- Ethylène glycol ... inférieur à 0,1 % en poids ;
- Eau ... inférieure à 0,5 % en poids.

6. Ether n-butylque du tripropylène glycol.

Ce solvant est constitué à 95 % par un mélange de 8 isomères et comporte des impuretés n'excédant pas les concentrations suivantes :

- Tétrapropylène glycol n butyléther ... 4 % en poids ;
- Dipropylène glycol n butyléther ... 1 % en poids ;
- Propylène glycol : 0,9 % en poids ;
- Allyl éther ... 0,8 % en poids ;
- Alcool allylique libre ... 0,05 % en poids ;
- Eau ... 0,15 % en poids.

7. Polyéthylèneglycols 300 et 400.

Ils doivent répondre aux spécifications suivantes :

- Monoéthylèneglycol + diéthylèneglycol : maximum 0,25 % ;
- Métaux lourds : inférieurs à 5 mg/kg ;
- Arsenic : inférieur à 3 mg/kg ;
- Cendres : inférieures à 0,1 % en poids ;
- Oxyde d'éthylène : inférieure à 10 mg/kg ;
- 1,4-dioxane : inférieure à 10 mg/kg ;
- pH en solution à 5 g/100 ml compris entre 4,5 et 7,5.

8. Isobutanol.

Cette substance est utilisable à la concentration maximale de 1 % dans des préparations aqueuses.

4. Quatrième groupe**Autres constituants****A. - Agents auxiliaires****1. Urée.**

On peut utiliser l'urée pour faire disparaître l'excès de chlore, après traitement par les hypochlorites, susceptibles de laisser une odeur ou un goût désagréables.

2. Glycol.

Cette substance, dont la formule est HO-CH₂-CH₂-OH, ne peut être employée dans des préparations qu'à la dose pondérale maximale de 1 %.

3. Propylène glycol (ou 1,2-propanediol).

Ce constituant répond aux caractéristiques de pureté de l'additif alimentaire ainsi désigné.

Il ne peut être employé dans des préparations qu'à la concentration pondérale maximale de 10 %.

4. Sorbitol.

Ce constituant répond aux caractéristiques de pureté de l'additif alimentaire E 420 i.

5. Acide borique.

Cet acide, ou ses sels de sodium, doivent répondre aux critères de pureté définis dans la pharmacopée française ou européenne. Ils ont un taux de sulfates inférieur ou égal à 450 milligrammes par kilogramme et une teneur totale en métaux lourds inférieure ou égale à 15 milligrammes par kilogramme.

Cet acide, ou ses sels de sodium, sont utilisables dans des produits désinfectants à titre d'agents effervescents. Les quantités mises en oeuvre doivent être juste nécessaires pour obtenir les effets technologiques recherchés.

6. Stéarate d'aluminium.

Ce constituant est un mélange de 65 % de distéarate $Al(OH)(C_{18}H_{35}O_2)_2$ et de 35 % de tristéarate $Al(C_{18}H_{35}O_2)_3$. Il a une pureté minimale de 92 %. Ses teneurs en acides gras libres, en eau et en cendres solubles sont respectivement d'environ 7 %, 2 % et 1,5 %.

7. Tétra-acétyl-éthylène-diamine.

Ce constituant contient plus de 98 % de tétra-acétyl-éthylène-diamine, également désignée par le nom de N-N'-éthylène-bis-diacétamide ou TAED. Il contient également 0,9 % de tri-acétyl-éthylène-diamine et environ 0,1 % de di-acétyl-éthylène-diamine.

Il est utilisé en présence de peroxyde d'hydrogène, provenant de composants autorisés. Il permet d'obtenir une préparation contenant de l'acide peracétique et de la di-acétyl-éthylène-diamine ou DAED. La teneur en acide peracétique de cette préparation doit être inférieure à celle qui permettrait de la présenter comme ayant des propriétés désinfectantes.

8. 2-octyldodécanol-1.

9. Stéarones.

Ces stéarones entrent dans la fabrication de préparations antimoussantes comportant elles-mêmes 80 % de 2-octyldodécanol-1 et 8 % de stéarones. La concentration maximale en stéarones dans un produit de nettoyage ne doit pas excéder 0,25 % (en poids). La composition de ces stéarones, dites également alkylcétones, répond aux caractéristiques suivantes (à environ γ 0,1 % près, en poids) :

Nonacosanone (en C29) ... 0 à 3,5 % en poids ;
Hentriacontanone (en C31) ... 1 à 19 % en poids ;
Tritriacontanone (en C33) ... 1 à 45 % en poids ;
Pentatriacontanone (en C35) ... 34,5 à 98 % en poids.

10. Alcool polyvinylique, dit PVA.

L'alcool polyvinylique est soluble dans l'eau à plus de 99 %. Sa teneur en méthanol est au maximum de 1 %.

Ce constituant est destiné à la fabrication de sachets servant au conditionnement de produits détergents pour le lavage de la vaisselle industrielle.

11. Sulfate de manganèse monohydraté.

Cette substance est pure à 98 %.

La teneur en sulfate de manganèse des bains de lavage obtenus par dilution des formulations mises dans le commerce ne doit pas excéder 6 mg/l en SO_4Mn (soit environ 2,2 mg de manganèse par litre).

12. Benzotriazole.

Cette substance, dite « 1,4-benzotriazole » ou « 1,2,3-benzotriazole », est pure au moins à 99 %. Elle contient au maximum 0,1 % de 1,2-aminotriazole.

Elle est utilisable comme agent anticorrosion. Sa concentration maximale dans les produits de nettoyage ne doit pas excéder 0,5 %.

13. Huile de paraffine.

Cette huile de paraffine, en C25-C45, présente une densité d'environ 0,865 à 20 °C.

Elle est utilisable à la teneur maximale de 2 %.

14. Diesters de polyéthylèneglycol.

Ces agents de surface non ioniques dits « polymères », ou agents de surface dispersants stériques, peuvent être représentés sous la forme : « R-PEO-R », où R désigne le produit de la condensation d'acides gras hydroxylés de formule générale « R'-CHOHR''-COOH », où R' et R'' correspondent à des chaînes hydrocarbonées, avec R' + R'' = 2 à 18 (exprimés en atomes de carbone).

B. - Conservateurs

1. Alcool benzylique.

Cette substance, dont la formule est : $C_6H_5-CH_2OH$, ne peut être employée dans des préparations qu'à la dose pondérale maximale de 0,5 %.

2. Acide benzoïque et ses sels de sodium, potassium et calcium.

Ces constituants répondent aux caractéristiques de pureté des additifs alimentaires E 210, E 211, E 212 et E 213.

Ces substances sont utilisables à la concentration maximale totale de 500 milligrammes par litre.

3. 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol.

La concentration pondérale en substance pure du constituant commercialisé est au moins de 97 %.

Ce constituant est utilisable à la concentration maximale pondérale de 0,1 %, dans des préparations ne contenant pas d'amines, destinées à être employées dans les industries agroalimentaires, à l'exception des laiteries, du matériel de laiterie et des produits de fermentation du lait.

4. 1,2-benzisothiazoline-3-one.

La substance commerciale a une teneur pondérale minimale de 90 % en 1,2-benzisothiazoline-3-one et de 93 % en 1,2-benzisothiazoline-3-one et en 2,2'-dithiobisbenzamide. Sa teneur pondérale maximale en 2,2'-dithiobisbenzamide ne dépasse pas 6 % et celle en chlorobenzisothiazolone n'excède pas 1 %.

Elle est utilisable dans les préparations à la concentration strictement nécessaire permettant d'obtenir l'effet conservateur recherché.

5. Orthophényl-phénolate de sodium.

Cette substance est utilisable à titre de conservateur antifongique à la concentration pondérale maximale de 0,3 %. L'orthophénylphénol (ou biphenyl-2-ol) peut également être utilisé en complément ou en remplacement de l'orthophényl-phénolate de sodium jusqu'à la concentration pondérale maximale de 0,3 %.

6. 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazoline-3-one, 2-méthyl-4-isothiazoline-3-one et 2-N-octyl-4-isothiazoline-3-one.

Les préparations utilisées comme conservateur contiennent au maximum 3 % d'un mélange de 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazoline-3-one et de 2-méthyl-4-isothiazoline-3-one, et 0,6 % de 2-N-octyl-4-isothiazoline-3-one.

Les quantités maximales de ces matières actives par kilogramme de produit de nettoyage ou de rinçage doivent être telles que, dans le liquide obtenu après dilution aqueuse de ces produits de nettoyage ou de rinçage, les concentrations en matières actives soient au maximum de 150 microgrammes du mélange de 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazoline-3-one et de 2-méthyl-4-isothiazoline-3-one et au maximum de 30 microgrammes de 2-N-octyl-4-isothiazoline-3-one, par kilogramme de liquide mis directement au contact des surfaces à nettoyer ou à rincer.

C. - Enzymes

1. Enzymes déjà autorisées dans les industries alimentaires.

Ces préparations enzymatiques sont celles mentionnées par l'arrêté du 5 septembre 1989 modifié relatif à l'emploi de préparations enzymatiques dans la fabrication de certaines denrées et boissons destinées à l'alimentation humaine.

2. Préparations d'enzyme protéolytique obtenue à partir de Bacillus lentus.

Ces préparations enzymatiques sont obtenues à partir d'une variante alcalophile d'un bacille non pathogène et non toxigène identifié à Bacillus lentus. Elles contiennent un concentré d'enzymes, constitué lui-même d'environ 20 à 30 % de protéines, dont 60 à 65 % d'entre elles possèdent une activité enzymatique.

3. Préparations d'enzyme lipasique.

L'enzyme est obtenue à partir d'une souche d'Aspergillus oryzae modifiée génétiquement en lui incorporant le gène codant pour la lipase spécifique 1,3 provenant d'Humicola lanuginosa. Ces préparations d'enzyme hydrolysent les liaisons ester dans les positions 1 et 3 d'un triglycéride.

Ces préparations sont utilisables jusqu'à une concentration d'environ 1 % dans des détergents pour lave-vaisselle à usages industriels.

4. Préparations de protéase alcaline.

L'enzyme est obtenue à partir d'une souche de Bacillus alcalophilus

modifiée génétiquement en lui incorporant le gène codant pour la protéase d'un autre Bacillus.

Ces préparations d'enzyme sont utilisables jusqu'à environ 2 % dans des détergents pour lave-vaisselle à usages industriels.

5. Préparations enzymatiques de protéase alcaline.

L'enzyme est obtenue à partir d'une souche de Bacillus alcalophilus modifiée génétiquement. Ces préparations d'enzyme contiennent une substance active qui ne diffère de celle décrite au 4 précité que par un acide aminé.

Elles sont utilisables jusqu'à environ 4,5 % dans des détergents pour lave-vaisselle à usages industriels.

6. Préparations enzymatiques d'alpha amylase.

L'enzyme est produite à partir d'une souche de Bacillus licheniformis elle-même obtenue par recombinaison génétique.

Ces préparations d'enzyme sont utilisables dans des détergents pour lave-vaisselle à usages industriels.

7. Préparations enzymatiques de protéase.

L'enzyme est obtenue à partir d'une souche recombinée de Bacillus lentus alcalinophile. Ces préparations d'enzyme contiennent une substance active qui ne diffère de celle décrite au 2 précité que par deux aminoacides.

Ces préparations sont utilisables dans des détergents pour lave-vaisselle à usages industriels jusqu'à une concentration d'environ 0,1 g/l, calculée en gramme de préparation par rapport à un litre de la solution de lavage.

8. Préparations enzymatiques de protéase.

L'enzyme est obtenue à partir d'une souche de Bacillus subtilis modifiée génétiquement comme organisme hôte d'expression pour la protéase alcaline de Bacillus lentus.

Ces préparations sont utilisables dans des détergents pour lave-vaisselle à usages industriels jusqu'à une concentration d'environ 5 %.

D. - Constituants dont l'emploi dans des denrées alimentaires est autorisé

1. Constituants, autres que les colorants, autorisés à titre d'additifs alimentaires par les dispositions prises en application du décret no 89-674 du 18 septembre 1989 relatif aux additifs pouvant être employés dans les denrées destinées à l'alimentation humaine.

Sauf lorsque des teneurs plus élevées sont prévues par les dispositions spécifiques à certains de ces constituants qui sont mentionnées dans la présente section I a, la concentration en additifs alimentaires présentée par la solution, ou par le produit, destinés à être placés directement au contact des matériaux et des objets ne doit pas excéder la plus forte des teneurs admises dans les aliments par la réglementation en vigueur.

E. - Matières aromatiques

Les matières aromatiques ne doivent être introduites dans des produits de nettoyage qu'en quantités strictement suffisantes pour donner à une spécialité une note parfumée destinée à la distinguer des autres produits.

1. Matières aromatiques dont il peut être démontré qu'elles sont inoffensives pour leur emploi dans des produits de nettoyage de matériaux entrant au contact d'aliments.

F. - Colorants

Sans préjudice des dispositions spécifiques à chacun d'eux, les colorants ne doivent être introduits dans des produits de nettoyage qu'en quantités strictement suffisantes pour donner à une spécialité un caractère destiné à la distinguer des autres produits.

1. Colorants autorisés dans des denrées alimentaires par les dispositions prises en application du décret no 89-674 du 18 septembre 1989 relatif aux additifs pouvant être employés dans les denrées destinées à l'alimentation humaine.

2. Bleu brillant FCF.

Ce colorant correspond à celui répertorié par le Colour Index sous le numéro 42090.

3. Colorant pyranine.

Ce colorant répond à la dénomination chimique suivante :

Sel de sodium de l'acide 8-hydroxy-1,3,6-pyrènetrisulfonique, ou encore :

Sel de sodium de l'acide 6-hydroxy-1,3,8-pyrènetrisulfonique.

Il ne peut être employé qu'à une dose inférieure à 0,05 gramme par kilogramme dans le produit mis en vente.

4. Phtalocyanine de cuivre chlorée.

Ce colorant correspond à celui identifié sous le numéro 74260 dans l'arrêté du 6 novembre 1986 fixant la liste des colorants que peuvent contenir les produits cosmétiques et les produits d'hygiène corporelle destinés à entrer en contact avec les muqueuses.

L'emploi de phtalocyanine de cuivre chlorée est autorisé à la concentration maximale de 0,005 % dans des produits de nettoyage des matériaux entrant au contact d'aliments.

5. Bleu sandolane E-HRL 180 - no CAS 72152-54-6.

G. - Azurants optiques

Les sels de sodium de ces azurants optiques peuvent être remplacés par leurs sels de potassium.

Tous ces azurants optiques présentent une pureté suffisante attestée par leur spectre et répondent aux mêmes critères de pureté que ceux qui sont exigés des pigments et colorants pour matières plastiques destinées à être mises au contact des denrées alimentaires.

1. Bis (phénylurée)-4,4'-stilbène-disulfonate-2,2' de sodium.

2. Bis (phénylamino-2) (diéthanolamine-6) triazinyl-1,3,5- amino-4-4,4'-stilbène-disulfonate-2,2' de sodium.

3. Bis (diphénylamino-2,5)-triazinyl-1,3,5-amino-4-4,4'- stilbène-disulfonate-2,2' de sodium.

4. Bis (phénylamino-2) (méthyléthanol-amino-6)-triazinyl-1,3,5- amino-4-4,4'-stilbène-disulfonate-2,2' de sodium.

5. Bis (parachlorophényl-amino-2) (diméthylamino-6)-triazinyl- 1,3,5-amino-4-4,4'-stilbène-disulfonate-2,2' de sodium.

6. Bis (éthylamino-2) (phénylamino-6)-triazinyl-1,3,5-amino-4- 4,4'-stilbène-disulfonate-2,2' de sodium.

7. Bis (méthoxy-2) (phénylamino-6)-triazinyl-1,3,5-amino-4- 4,4'-stilbène-disulfonate-2,2' de sodium.

8. Bis (parasulfophénylamino-2) (diéthylamino-6)-triazinyl- 1,3,5-amino-4-4,4'-stilbène-disulfonate-2,2' de sodium.

9. Bis (parasulfophénylamino-2) (dicyanoéthylamino-6)-triazinyl-1,3,5-amino-4-4,4'-stilbène-disulfonate-2,2' de sodium.

10. Bis (anilino-2) (méthoxyéthylène-amino-6)-triazinyl-1,3,5- amino-4-4,4'-stilbène-disulfonate-2,2' de sodium.

11. Bis (phénylamino-2) (morpholino-6)-triazinyl-1,3,5- amino-4-4,4'-stilbène-disulfonate-2,2' de sodium.

12. (Stilbyl 4» = 2) (naphto 1'-2' = 4 - 5) triazole-1,2,3-sulfonate-2» de sodium.

13. (Diméthylamino-3,5) (méthylcarboxylamide-6) (sulfamyl-3)-phényl-carboxylamide-2-pyrazine.

14. (Parasulfamidophényl-1) (parachlorophényl-3) (dihydro-4,5)-pyrazole, ou (parasulfamidophényl-1) (parachlorophényl-3)-pyrazoline.

15. Alpha (benzimidazolyl 2) bêta (N-hydroxyéthylbenzimidazolyl 2) éthylène.

H. - Répulsifs

1. Benzoate de dénatonium.

Cette substance est également désignée sous le nom de benzoate de N-2-(2,6-diméthyl phényl)-amino-2-oxoéthyl-N,N-diéthylbenzène méthammonium.

Cette substance est utilisable à la concentration strictement nécessaire à l'effet répulsif recherché.

SECTION I b

Constituants des produits de nettoyage, autres que ceux destinés au rinçage de la vaisselle, présentés comme pouvant ne pas être rincés à l'eau potable après usage

Sauf dispositions particulières qui, le cas échéant, accompagnent les désignations mentionnées ci-dessous, les constituants de la présente section, quels que soient leurs effets, désinfectant ou autres, sont réservés à des utilisations industrielles.

1. Eau oxygénée.

Ce constituant est utilisable dans des solutions aqueuses destinées

à traiter des emballages de liquides alimentaires. L'élimination des solutions après usage peut être réalisée par séchage à l'air stérile à 280 °C.

2. Monolaurate de polyoxyéthylène 20 sorbitane.

Il doit répondre aux spécifications de la pharmacopée française ou européenne.

Il est utilisable en mélange dans des solutions aqueuses d'eau oxygénée destinées à traiter des emballages de liquides alimentaires. L'élimination de ces solutions après usage peut être réalisée par séchage à l'air stérile à 280 °C. Le résidu maximal en polysorbate 20, sur la face interne de ces emballages, doit être tel qu'il ne puisse y en avoir plus de 0,12 mg par litre de liquide alimentaire conditionné.

3. Acide sorbique.

Cet acide répond aux caractéristiques de l'additif alimentaire E 200. Il est utilisable à la concentration maximale pondérale de 3 % dans des solutions hydroalcooliques, elles-mêmes employées par pulvérisation ou par trempage. Lorsque ces solutions sont utilisées pour des traitements autres que ceux de tuyauteries ou de systèmes clos, le rinçage peut ne pas être réalisé, compte tenu de la faible quantité d'acide sorbique restant à la surface des matériaux.

4. Polyvinylpyrrolidone.

Ce constituant répond aux caractéristiques pondérales suivantes :

- teneur en métaux lourds n'excédant pas 10 mg par kg ;
- teneur en hydrazine inférieure à 3 mg par kg ;
- teneur en monomères inférieure ou égale à 0,2 % et teneur en aldéhyde inférieure ou égale à 0,2 %.

Il est employé exclusivement dans des solutions hydroalcooliques contenant au plus 3 % d'acide sorbique. La proportion en polyvinylpyrrolidone desdites solutions ne doit pas être plus forte que celle strictement nécessaire à l'effet recherché.

5. Aldéhyde formique.

Ce constituant peut notamment être obtenu, sur le lieu de sa mise en œuvre, par dépolymérisation.

Sous sa forme gazeuse, le formaldéhyde ne peut être employé pour traiter des matériaux entrant en contact d'aliments, ou des locaux comportant de tels matériaux, qu'en respectant les dispositions suivantes :

Ce traitement est réalisé en absence d'aliment.

Il est précédé d'un lavage et d'un rinçage destinés à éliminer les salissures des matériaux qui entreraient au contact d'aliments.

Il est suivi, éventuellement, par l'emploi d'une substance neutralisante autorisée, comme l'ammoniac ; dans tous les cas, le mélange gazeux

couvrant les matériaux doit être remplacé par de l'air, de façon que la teneur résiduelle de l'air en formaldéhyde soit inférieure à 3 mg/m³ lorsque des denrées alimentaires seront mises au contact des matériaux ainsi traités.

6. Parahydroxyphénylsalicylamide.

Cette substance antifongique est utilisable à sec pour la désinfection de surfaces par voie aérienne à la dose maximale de 0,15 gramme par mètre cube du volume des locaux à traiter, tels que hâloirs à fromages et à saucissons ainsi que entrepôts de céréales, fruits et légumes secs. Les opérations de dispersion de la substance active sont réalisées, hors de toute présence humaine ou animale, dans des locaux ne contenant pas d'aliments. La base de fumigation comburante qui, le cas échéant, est utilisée pour assurer la dispersion de la parahydroxyphénylsalicylamide ne peut être composée que de substances présentes en quantités strictement nécessaires à l'effet recherché et ne produisant pas de résidus susceptibles de contaminer anormalement les locaux ainsi traités.

SECTION II

Constituants présentant des effets désinfectants ou conservateurs, utilisés dans les produits suivis d'un rinçage, ou destinés à être introduits dans les baignoires de rinçage de la vaisselle, qui sont destinés à des usages autres qu'industriels

Les constituants de la section II sont tous ceux de la section I a qui, du fait de leur nature et de leurs concentrations d'emploi, présentent des propriétés qui sont celles de désinfectants ou de conservateurs.

Ils doivent respecter les dispositions mentionnées à la section I a. En particulier leurs teneurs dans les produits commercialisés ne doivent pas excéder les concentrations maximales ou les quantités strictement nécessaires qui sont, le cas échéant, prévues à la même section I a.

SECTION III

Constituants qui sont des organismes génétiquement modifiés (Pour mémoire)

SECTION IV

Constituants utilisables comme catalyseurs et appartenant à la 1re ou à la 2e catégorie des substances classées cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction (Pour mémoire)

CHAPITRE XI

L'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES ALIMENTS

Le règlement CE 172/2002 réaffirme qu'aucune denrée alimentaire n'est mise sur le marché si elle est dangereuse et que les risques microbiologiques constituent une source majeure de maladies d'origine alimentaire chez l'Homme.

Les établissements concernés sont responsables d'un plan de maîtrise sanitaire comprenant l'ensemble des dispositions assurant l'hygiène et la sécurité sanitaire de leurs productions.

Les contrôles microbiologiques, qu'ils soient réglementaires ou non, mis en place à titre d'autocontrôles, entrent dans le cadre de ces dispositions. Le cadre légal en est le règlement CE 2073/2005 qui constitue le socle minimum des critères devant être pris en compte. Réalisés dans les laboratoires des industries agro-alimentaires ou dans des laboratoires de contrôle de la qualité des aliments, ils doivent être conduits selon des méthodes de référence prescrites par des **normes** et des méthodes alternatives validées par l'organisme de certification AFAQ- AFNOR et conformes aux dispositions de l'article 5 et à l'annexe de ce règlement.

La réglementation CE 2073/2005 distingue de façon explicite deux types de **critères microbiologiques** :

- les **critères de sécurité alimentaire** qui s'appliquent aux produits mis sur le marché et dont le non-respect doit entraîner le retrait du produit ;
- les **critères d'hygiène du procédé** qui ne s'appliquent pas aux produits mis sur le marché et permettent d'évaluer le bon fonctionnement du procédé sur le plan hygiénique en fixant des valeurs indicatives de contamination dont le dépassement implique l'identification de l'origine de la défaillance et la mise en place d'actions correctives.

1. Les prélèvements

1.1. Quelques définitions

Selon la réglementation 2073/2005 (article 2) :

- un **lot** est « un groupe ou une série de produits identifiables obtenus par un procédé donné dans des conditions pratiquement identiques, produits dans un endroit identique et une période de production déterminée » ;
- un **échantillon** est « un ensemble composé d'une ou plusieurs unité(s) ou une portion de matière, sélectionné dans une population ou dans une quantité importante de matière et destiné à fournir des informations sur une caractéristique donnée de la population ou de la matière »
- un **échantillon représentatif** est « un échantillon dans lequel on retrouve les caractéristiques du lot dont il est issu ».

1.2. L'échantillonnage

La réglementation précise pour chaque denrée le nombre d'unités n de prélèvements constituant l'échantillon (*voir 3. les critères microbiologiques*).

1.3. Techniques du prélèvement

Elles sont explicitées pour chaque denrée par les normes de référence. Pour les prélèvements en surface à l'aide d'une boîte contact ou d'un écouvillon, il s'agit de la norme NF ISO 18593. Pour des prélèvements associant la profondeur, chaque prélèvement élémentaire est généralement recueilli à l'aide d'un bistouri pour les aliments de consistance dure ou d'une cuillère pour ceux de consistance molle, en des points différents d'un lot. Ces prélèvements sont transférés dans un bocal stérile ou un sac en matière plastique fermé par un bracelet en caoutchouc.

1.3.1. Cas particuliers

- **Évaluation de la flore microbienne de surface**

Elle peut être demandée pour rechercher une contamination superficielle. Le laboratoire doit disposer d'un échantillon d'environ 25 cm² de surface pour 5 mm d'épaisseur.

- **Évaluation de la flore profonde**

Il importe, dans ce cas, d'éliminer la flore de surface par stérilisation et de prélever au cœur de l'échantillon un bloc dont les trois dimensions sont de l'ordre de 5 à 10 cm. Ce type de prélèvement concerne les viandes de boucherie et de demi-gros ainsi que les salaisons.

- **Cas des denrées congelées**

Pratiquer des trous selon les consignes de la norme AFNOR V 4501 à l'aide d'une perceuse (mèche de 14 mm). Rassembler les copeaux dans un sac stérile.

1.3.2. Transport des prélèvements

Les aliments prélevés sont acheminés au laboratoire dans des conteneurs isothermes garnis d'un agent réfrigérant : glace (2 à 3 fois la masse des échantillons à transporter), neige carbonique. Afin d'éviter les pertes de froid, leur volume est voisin de celui des denrées transportées.

1.3.3. L'opérateur

Ce doit être une personne possédant de bonnes connaissances en microbiologie et en hygiène. Elle doit connaître les mesures à prendre pour éviter la contamination accidentelle de l'aliment sur lequel sont effectués les prélèvements.

2. L'analyse

La description des protocoles sort du cadre de cet ouvrage. Rappelons seulement les techniques de dénombrement les plus utilisées en microbiologie alimentaire.

- **L'incorporation en milieu gélosé de volumes constants de différentes dilutions provenant de quantités connues d'un échantillon**

L'échantillon est pesé, puis généralement broyé dans un volume connu de diluant. La concentration pondérale de cette dilution mère peut ainsi être facilement calculée et exprimée en grammes par cm³. On pratique alors différentes dilutions de la suspension ; un volume connu de chaque dilution (1 cm³) est incorporé dans la masse d'un milieu gélosé. Après incubation (la température d'incubation dépend de la nature de la population que l'on souhaite dénombrer), les colonies sont comptées. Chacune correspond à une bactérie revivifiable.

- **La filtration sur membrane de volumes connus de différentes dilutions de la denrée à analyser**

Les membranes sur lesquelles les bactéries ont été retenues sont déposées sur des milieux gélosés adaptés, et les colonies sont comptées comme précédemment. Connaissant la concentration pondérale de la suspension de départ, il est possible, par un calcul simple, de donner des résultats en nombre de bactéries par gramme d'aliment : cette formulation étant la seule facilement exploitable.

Soit, par exemple, p grammes d'aliment broyé dans V cm³ de liquide ; si (n) est le nombre de colonies comptées à la dilution 1/d, le nombre de bactéries par gramme d'aliment sera :

$$N = \frac{n \cdot d \cdot p}{V}$$

Selon le milieu utilisé, des populations plus ou moins étendues peuvent ainsi être évaluées. En choisissant un milieu riche, non sélectif, avec incubation à 30 °C, on dénombre les micro-organismes « totaux » se développant à cette température. Les résultats obtenus permettent d'évaluer la qualité des matières premières et l'hygiène générale de toute la chaîne de manutention, y compris pour les denrées ayant subi plusieurs transformations. Différents milieux sélectifs sont adaptés à la numération de populations mieux ciblées et plus significatives quant au risque sanitaire : staphylocoques, streptocoques fécaux, entérobactéries coliformes totaux (incubation à 30 °C) et fécaux (incubation à 44 °C), *Clostridium* sulfite-réducteurs, *Salmonella*...

3. Critères microbiologiques fixés par le règlement européen n° 2073/2005 (publié au journal officiel de l'Union européenne le 22 décembre 2005)

3.1 Critères de sécurité des denrées alimentaires

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes/ toxines, métabolites	Plans d'échantillonnage (1)		Limites (2)		Méthode d'analyse de référence (3)	Stade d'application du critère
		n	c	m	M		
Denrées alimentaires prêtes à être consommées destinées aux nourrissons et denrées alimentaires prêtes à être consommées destinées à des fins médicales spéciales (4)	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 11290-1	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Denrées alimentaires prêtes à être consommées permettant le développement de <i>L. monocytogenes</i> , autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g (5)		EN/ISO 11290-2 (6)	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
		5	0	Absence dans 25 g (7)		EN/ISO 11290-1	Avant que la denrée alimentaire n'ait quitté le contrôle immédiat de l'opérateur qui l'a fabriquée
Denrées alimentaires prêtes à être consommées ne permettant pas le développement de <i>L. monocytogenes</i> , autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales (4) (8)	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11290-2 (6)	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Viande hachée et préparations de viande destinées à être consommées crues	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Viande hachée et préparations de viande de volailles destinées à être consommées cuites	<i>Salmonella</i>	5	0	À partir du 1.1.2006 Absence dans 10 g À partir du 1.1.2010 Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Viande hachée et préparations de viande d'autres espèces que les volailles destinées à être consommées cuites	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 10 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Viandes séparées mécaniquement (9)	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 10 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Produits à base de viande destinés à être consommés crus, excepté les produits dont le procédé de fabrication ou la composition permettent de supprimer le risque salmonelles	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Produits à base de viande de volaille destinés à être consommés cuits	<i>Salmonella</i>	5	0	À partir du 1.1.2006 Absence dans 10 g À partir du 1.1.2010 Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Gélatine et collagène	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
		5	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Fromages, beurre et crème fabriqués à partir de lait cru ou de lait traité à une température inférieure à celle de la pasteurisation (10)	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes/ toxines, métabolites	Plans d'échantillonnage (1)		Limites (2)		Méthode d'analyse de référence (3)	Stade d'application du critère
		n	c	m	M		
Lait en poudre et lactosérum en poudre (10)	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Crèmes glacées (11), excepté les produits dont le procédé de fabrication ou la composition permettent de supprimer le risque salmonelles	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Ovoproduits, excepté les produits dont le procédé de fabrication ou la composition permettent de supprimer le risque salmonelles	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Denrées alimentaires prêtes à être consommées contenant des œufs crus, excepté les produits dont le procédé de fabrication ou la composition permettent de supprimer le risque salmonelles	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g ou ml		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Crustacés et mollusques cuits	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Mollusques bivalves vivants et échinodermes, tuniciens et gastéropodes vivants	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Graines germées (prêtes à être consommées) (12)	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Fruits et légumes prédécoupés (prêts à être consommés)	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Jus de fruits et de légumes non pasteurisés (prêts à être consommés)	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Fromages, lait en poudre et lactosérum en poudre, visés dans les critères staphylocoques à coagulase positive au chapitre 2.2 de la présente annexe	Entérotoxines staphylococciques	5	0	Pas de détection dans 25 g		Méthode européenne de dépistage du LCR pour le lait (13)	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Préparations en poudre pour nourrissons et aliments diététiques en poudre destinés à des fins médicales spéciales pour nourrissons de moins de six mois, visées dans le critère applicable aux entérobactériacés au chapitre 2.2 de la présente annexe	<i>Salmonella</i>	30	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Préparations en poudre pour nourrissons et aliments diététiques en poudre destinés à des fins médicales spéciales pour nourrissons de moins de six mois, visées dans le critère applicable aux entérobactériacés au chapitre 2.2 de la présente annexe	<i>Enterobacter sakazakii</i>	30	0	Absence dans 10 g		ISO/DTS 22964	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Mollusques bivalves vivants et échinodermes, tuniciens et gastéropodes vivants	<i>E. coli</i> (14)	1 (15)	0	230 NPP/100 g de chair et de liquide intravalvaire		ISO TS 16649-3	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Produits de la pêche fabriqués à partir d'espèces de poissons associées à une grande quantité d'histidine (16)	Histamine	9 (17)	2	100 mg/kg	200 mg/kg	HPLC (18)	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Produits de la pêche ayant subi un traitement de maturation aux enzymes dans la saumure, fabriqués à partir d'espèces de poissons associées à une grande quantité d'histidine (16)	Histamine	9	2	200 mg/kg	400 mg/kg	HPLC (18)	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation

(1) n = nombre d'unités constituant l'échantillon; c = nombre maximal de résultats pouvant présenter des valeurs comprises entre m et M, pour le nombre d'échantillons n réalisé.

(2) Pour les points 1.1 à 1.24, m = M

(3) Il y a lieu d'utiliser l'édition la plus récente de la norme.

(4) Des essais périodiques fondés sur ce critère ne sont pas utiles, en temps normal, pour les denrées alimentaires prêtes à être consommées suivantes:

- Denrées alimentaires ayant fait l'objet d'un traitement thermique ou d'une autre transformation efficace pour éliminer *L. monocytogenes*, lorsque la recontamination n'est pas possible après ce traitement (par exemple les produits traités thermiquement dans leur emballage final),
 - Fruits et légumes frais, non découpés et non transformés, à l'exception des graines germées,
 - Pain, biscuits et produits similaires,
 - Eaux, boissons non alcoolisées, bière, cidre, vin, boissons spiritueuses en bouteille ou conditionnées et produits similaires,
 - Sucre, miel et confiserie, y compris les produits à base de cacao et de chocolat,
 - Mollusques bivalves vivants.
- (5) Ce critère est applicable lorsque le fabricant est en mesure de démontrer, à la satisfaction de l'autorité compétente, que le produit respectera la limite de 100 ufc/g pendant la durée de conservation. L'exploitant peut fixer, pendant le procédé, des valeurs intermédiaires suffisamment basses pour garantir que la limite de 100 ufc/g ne sera pas dépassée au terme de la durée de conservation,
- (6) 1 ml d'inoculum est déposé sur une boîte de Petri d'un diamètre de 140 mm ou sur trois boîtes de Petri d'un diamètre de 90 mm.
- (7) Ce critère est applicable aux produits avant qu'ils ne quittent le contrôle immédiat de l'exploitant du secteur alimentaire, lorsque celui-ci n'est pas en mesure de démontrer, à la satisfaction de l'autorité compétente, que le produit respectera la limite de 100 ufc/g pendant toute la durée de conservation.
- (8) Les produits pour lesquels $pH \leq 4,4$ ou $a_w \leq 0,92$, les produits pour lesquels $pH \leq 5,0$ et $a_w \leq 0,94$, les produits à durée de conservation inférieure à cinq jours appartiennent automatiquement à cette catégorie. D'autres catégories de produits peuvent aussi appartenir à cette catégorie, sous réserve d'une justification scientifique.
- (9) Ce critère est applicable aux viandes séparées mécaniquement produites par les techniques visées au chapitre III, paragraphe 3, de la section V de l'annexe III du règlement (CE) n° 853/2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale.
- (10) Excepté les produits pour lesquels le fabricant peut démontrer, à la satisfaction des autorités compétentes, qu'en raison du temps d'affinage et de la valeur a_w du produit, il n'y a aucun risque de contamination par les salmonelles.
- (11) Uniquement les crèmes glacées contenant des ingrédients laitiers.
- (12) Le lot de graines devrait être analysé avant le début du processus de germination ou de l'échantillonnage qui doit être mené à l'étape où la probabilité de trouver des salmonelles est la plus grande.
- (13) Référence: Hennekinne et al., J. AOAC Internat. Vol. 86, N°2, 2003
- (14) *E. coli* est utilisée ici comme indicateur de contamination fécale
- (15) Échantillon groupé comprenant au moins dix animaux différents
- (16) En particulier les espèces de poissons des familles *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryphaenidae*, *Pomatomidae*, *Scomberosocidae*
- (17) Des échantillons uniques peuvent être prélevés au niveau de la vente au détail. Dans ce cas, la présomption de l'article 14, paragraphe 6, du règlement (CE) n°178/2002, selon laquelle tout le lot doit être considéré comme dangereux, n'est pas applicable.
- (18) Références: 1. Malle P., Valle M., Bouquelet S., Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. J. AOAC Internat. 1996. 79. 43-49
2. Duflos G., Dervin C., Malle P., Bouquelet S. Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in plaice (*Pleuronectes platessa*) and whiting (*Merlangus merlangus*). J. AOAC Internat. 1999, 82, 1097-1101

3.2 Critères d'hygiène des procédés

3.2.1 Viandes et produits à base de viandes

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes	Plans 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			
Carcasses de bovins, d'ovins, de caprins et d'équidés ⁽⁴⁾	Nombre de colonies aérobies			3,5 log ufc/cm ² log moyen quotidien	5,0 log ufc/cm ² log moyen quotidien	ISO 4833	Carcasses après l'habillage, mais avant le ressuage	Amélioration de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédés
	Enterobacteriaceae			1,5 log ufc/cm ² log moyen quotidien	2,5 log ufc/cm ² log moyen quotidien	ISO 21528-2	Carcasses après l'habillage, mais avant le ressuage	Amélioration de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédés
Carcasses de porcins ⁽⁴⁾	Nombre de colonies aérobies			4,0 log ufc/cm ² log moyen quotidien	5,0 log ufc/cm ² log moyen quotidien	ISO 4833	Carcasses après l'habillage, mais avant le ressuage	Amélioration de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédés
	Enterobacteriaceae			2,0 ufc/cm ² log moyen quotidien	3,0 ufc/cm ² log moyen quotidien	ISO 21528-2	Carcasses après l'habillage, mais avant le ressuage	Amélioration de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédés
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'habillage, mais avant le ressuage	Amélioration de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédés et de l'origine des animaux
Carcasses de porcins	<i>Salmonella</i>	50 ⁽⁵⁾	5 ⁽⁶⁾	Absence dans la partie examinée de la carcasse		EN/ISO 6579	Carcasses après l'habillage, mais avant le ressuage	Amélioration de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédés, de l'origine des animaux et des mesures de biosécurité dans les exploitations d'origine

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes	Plans 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			
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 l'habillage, mais avant le ressuage	Amélioration de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédés, de l'origine des animaux et des mesures de biosécurité dans les exploitations d'origine
Viande hachée	Nombre de colonies aérobies	5	2	5x10 ⁵ ufc/g	5x10 ⁵ ufc/g	ISO 4833	Fin du procédé de fabrication	Amélioration de l'hygiène de production et améliorations de la sélection et/ou de l'origine des matières premières
	<i>E. coli</i> ⁽⁸⁾	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g	ISO 16649-1 ou 2	Fin du procédé de fabrication	Amélioration de l'hygiène de production et améliorations de la sélection et/ou de l'origine des matières premières
Viandes séparées mécaniquement ⁽⁹⁾ (VSM)	Nombre de colonies aérobies	5	2	5x10 ⁵ ufc/g	5x10 ⁵ ufc/g	ISO 4833	Fin du procédé de fabrication	Amélioration de l'hygiène de production et améliorations de la sélection et/ou de l'origine des matières premières
	<i>E. coli</i> ⁽⁸⁾	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g	ISO 16649-1 ou 2	Fin du procédé de fabrication	Amélioration de l'hygiène de production et améliorations de la sélection et/ou de l'origine des matières premières
Préparations de viande	<i>E. coli</i> ⁽⁷⁾	5	2	500 ufc/g ou cm ²	5 000 ufc/g ou cm ²	ISO 16649-1 ou 2	Fin du procédé de fabrication	Amélioration de l'hygiène de production et améliorations de la sélection et/ou de l'origine des matières premières

(1) n = nombre d'unités constituant l'échantillon; c = nombre maximal de résultats pouvant présenter des valeurs comprises entre m et M, pour le nombre d'échantillons n réalisé

(2) pour les points 2.1.3 à 2.1.5, m = M

(3) Il convient d'utiliser l'édition la plus récente de la norme

(4) Ces limites (m et M) ne s'appliquent qu'aux échantillons prélevés par la méthode destructive. Le log moyen quotidien est calculé en prenant un log de chacun des différents résultats d'analyse et en calculant ensuite la moyenne de ces logs

(5) Les cinquante échantillons sont prélevés au cours de dix échantillonnages consécutifs conformément aux règles et à la fréquence d'échantillonnage fixées dans le présent règlement

(6) Nombre d'échantillons où la présence de salmonelles est détectée. La valeur c est soumise à réexamen afin de prendre en compte les progrès réalisés en matière de réduction de la prévalence des salmonelles. Les États membres ou les régions où la prévalence des salmonelles est faible peuvent utiliser des valeurs c moins élevées, même avant le réexamen.

(7) Ce critère ne s'applique pas aux viandes hachées produites au détail lorsque la durée de conservation est inférieure à 24 heures.

(8) *E. coli* est utilisée ici comme indicateur de contamination fécale

(9) Ce critère s'applique aux viandes séparées mécaniquement produites par les techniques visées au chapitre III, paragraphe 3, de la section V de l'annexe III du règlement (CE) n°853/2004 fixant des règles particulières d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale

3.2.2 Lait et produits laitiers

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes	Plans 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			
Lait pasteurisé et autres produits laitiers liquides pasteurisés ⁽⁴⁾	Enterobactériaceae	5	2	< 1 ufc/ml	5 ufc/ml	ISO 21528-1	Fin du procédé de fabrication	Contrôle de l'efficacité du traitement thermique et prévention de la recontamination et contrôle de la qualité des matières premières
Fromages à base de lait ou de lactosérum ayant subi un traitement thermique	<i>E. coli</i> ⁽⁵⁾	5	2	100 ufc/g	1 000 ufc/g	ISO 16649-1 ou 2	Pendant le procédé de fabrication, au moment où l'on prévoit le nombre d' <i>E. coli</i> le plus élevé ⁽⁶⁾	Améliorations de l'hygiène de la production et de la sélection des matières premières
Fromages au lait cru	Staphylocoques à coagulase positive	5	2	10 ⁴ ufc/g	10 ⁵ ufc/g	EN/ISO 6888-2	Pendant le procédé de fabrication, au moment où l'on prévoit le nombre de staphylocoques à coagulase positive le plus élevé	Améliorations de l'hygiène de la production et de la sélection des matières premières. Lorsque des valeurs > 10 ⁵ ufc/g sont détectées, le lot de fromages doit faire l'objet d'une recherche des entérotoxines staphylococciques.
Fromages à base de lait ayant subi un traitement thermique moins fort que la pasteurisation ⁽⁷⁾ et fromages affinés à base de lait ou de lactosérum pasteurisés ou ayant subi un traitement thermique plus fort que la pasteurisation ⁽⁷⁾	Staphylocoques à coagulase positive	5	2	100 ufc/g	1 000 ufc/g	EN/ISO 6888-1 ou 2		
Fromages à pâte molle non affinés (fromages frais) à base de lait ou de lactosérum pasteurisés ou ayant subi un traitement thermique plus fort que la pasteurisation ⁽⁷⁾	Staphylocoques à coagulase positive	5	2	10 ufc/g	100 ufc/g	EN/ISO 6888-1 ou 2	Fin du procédé de fabrication	Améliorations de l'hygiène de la production. Lorsque des valeurs > 10 ⁶ ufc/g sont détectées, le lot de fromages doit faire l'objet d'une recherche des entérotoxines staphylococciques
Beurre et crème au lait cru ou lait ayant subi un traitement thermique plus faible que la pasteurisation	<i>E. coli</i> ⁽⁵⁾	5	2	10 ufc/g	100 ufc/g	ISO 16649-1 ou 2	Fin du procédé de fabrication	Améliorations de l'hygiène de la production et de la sélection des matières premières
Lait en poudre et lactosérum en poudre ⁽⁴⁾	Enterobactériaceae	5	0	10 ufc/g		ISO 21528-1	Fin du procédé de fabrication	Contrôle de l'efficacité du traitement thermique et prévention de la recontamination
	Staphylocoques à coagulase positive	5	2	10 ufc/g	100 ufc/g	EN/ISO 6888-1 ou 2	Fin du procédé de fabrication	Amélioration de l'hygiène de production. Lorsque des valeurs > 10 ⁵ ufc/g sont détectées, le lot de fromages doit faire l'objet d'une recherche des entérotoxines staphylococciques
Crèmes glacées ⁽⁸⁾ et desserts lactés congelés	Enterobactériaceae	5	2	10 ufc/g	100 ufc/g	ISO 21528-2	Fin du procédé de fabrication	Améliorations de l'hygiène de production.

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes	Plans 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			
Préparations en poudre pour nourrissons et aliments diététiques en poudre destinés à des fins médicales spéciales pour nourrissons de moins de six mois	Enterobactériaceae	10	0	Absence dans 10 g		ISO 21528-1	Fin du procédé de fabrication	Améliorations de l'hygiène de production destinées à réduire la contamination. Lorsque des <i>Enterobacteriaceae</i> sont détectés dans une seule unité d'échantillonnage, le lot doit faire l'objet d'une recherche d' <i>E. sakazakii</i> et de <i>Salmonella</i>

- (1) n= nombre d'unités constituant l'échantillon; c = nombre maximal de résultats pouvant présenter des valeurs comprises entre m et M, pour le nombre d'échantillons n réalisé
- (2) Pour le point 2.2.7, m = M
- (3) Il convient d'utiliser l'édition la plus récente de la norme
- (4) Ce critère ne s'applique pas aux produits destinés à être encore transformés dans le secteur alimentaire
- (5) *E. coli* est utilisée ici comme niveau d'indicateur du niveau d'hygiène
- (6) Pour les fromages ne permettant pas le développement d'*E. coli*, le nombre d'*E. coli* est généralement le plus élevé au début de la période d'affinage, et pour les fromages permettant le développement d'*E. coli*, il l'est en principe à la fin de la période d'affinage
- (7) À l'exception des fromages pour lesquels le fabricant peut démontrer, à la satisfaction des autorités compétentes, qu'ils ne présentent aucun risque de contamination par entérotoxines staphylococciques
- (8) Uniquement les crèmes glacées contenant des ingrédients lactés

3.2.3 Ovoproduits

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes	Plans d'échantillonnage ⁽¹⁾		Limites		Méthode d'analyse de référence ⁽²⁾	Stade d'application du critère	Action en cas de résultats insatisfaisants
		n	c	m	M			
Ovoproduits	Enterobactériaceae	5	2	10 ufc/g ou ml	100 ufc/g ou ml	ISO 21528-2	Fin du procédé de fabrication	Contrôle de l'efficacité du traitement thermique et prévention de la recontamination

- (1) n= nombre d'unités constituant l'échantillon; c = nombre maximal de résultats pouvant présenter des valeurs comprises entre m et M, pour le nombre d'échantillons n réalisé
- (2) Il convient d'utiliser l'édition la plus récente de la norme

3.2.4 Produits de la pêche

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes	Plans d'échantillonnage ⁽¹⁾		Limites		Méthode d'analyse de référence ⁽²⁾	Stade d'application du critère	Action en cas de résultats insatisfaisants
		n	c	m	M			
Produits décortiqués et décoquillés de crustacés et de mollusques cuits	<i>E. coli</i>	5	2	1 ufc/g	10 ufc/g	ISO TS 16649-3	Fin du procédé de fabrication	Améliorations de l'hygiène de production.
	Staphylocoques à coagulase positive	5	2	100 ufc/g	1 000 ufc/g	EN/ISO 6888-1 ou 2	Fin du procédé de fabrication	Améliorations de l'hygiène de production.

- (1) n= nombre d'unités constituant l'échantillon; c = nombre maximal de résultats pouvant présenter des valeurs comprises entre m et M, pour le nombre d'échantillons n réalisé
- (2) Il convient d'utiliser l'édition la plus récente de la norme

3.2.5 Légumes, fruits et produits à base de légumes et de fruits

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes	Plans d'échantillonnage ⁽¹⁾		Limites		Méthode d'analyse de référence ⁽²⁾	Stade d'application du critère	Action en cas de résultats insatisfaisants
		n	c	m	M			
Fruits et légumes pré-découpés (prêts à être consommés)	<i>E. coli</i>	5	2	100 ufc/g	1 000 ufc/g	ISO 16649-1 ou 2	Procédé de fabrication	Améliorations de l'hygiène de production et de la sélection des matières premières.
Jus de fruits et de légumes non pasteurisés (prêts à être consommés)	<i>E. coli</i>	5	2	100 ufc/g	1 000 ufc/g	ISO 16649-1 ou 2	Procédé de fabrication	Améliorations de l'hygiène de production et de la sélection des matières premières.

(1) n = nombre d'unités constituant l'échantillon; c = nombre maximal de résultats pouvant présenter des valeurs comprises entre m et M, pour le nombre d'échantillons n réalisé

(2) Il convient d'utiliser l'édition la plus récente de la norme

4. L'interprétation des résultats

4.1. Le plan à deux classes

Deux réponses sont possibles.

- 1^{er} cas : présence ou absence d'un micro-organisme dans une quantité donnée d'aliment (10 ou 25g).

Ce type de réponse concerne certaines bactéries très pathogènes et plus particulièrement dans le cadre des critères de sécurité alimentaire. Aucune tolérance, par exemple, n'est acceptée pour les *Salmonella*: la qualité d'une denrée ne peut être jugée satisfaisante qu'en l'absence de *Salmonella* dans 10 ou 25g selon les denrées, ceci dans toutes les unités de prélèvement. Il en est de même pour *Listeria monocytogenes* dans les denrées destinées aux nourrissons ou les autres denrées prêtes à être consommées dans lesquelles *Listeria* est susceptible de se développer. De même, l'absence d'entérotoxine staphylococcique est exigée pour certains fromages et produits laitiers.

- 2^e cas : nombre de micro-organismes supérieur ou inférieur à une limite

La qualité est considérée comme satisfaisante lorsque toutes les valeurs sont inférieures à la limite fixée. Citons l'exemple de la recherche d'*Escherichia coli* dans la chair des bivalves vivants et celle de *Listeria monocytogenes* dans les denrées prêtes à être consommées et ne permettant pas le développement de cette bactérie. Dans ce dernier cas, le nombre d'unités de prélèvement est n=5 et la limite fixée de 10µg/g. Si les cinq unités de prélèvement donnent des résultats inférieurs à cette limite, la qualité du produit peut être considérée comme satisfaisante.

4.2. Le plan à trois classes

L'interprétation des résultats prend en compte quatre paramètres :

- n, le nombre d'unités de prélèvement;
- m et M les limites fixées pour la concentration du micro-organisme recherché;
- c, le nombre maximum d'unités de prélèvement pour lequel la concentration microbienne peut se situer entre m et M.
 - 1^{er} cas : toutes les valeurs obtenues sont inférieures ou égales à m : la qualité de la denrée est, sur ce critère, satisfaisante.
 - 2^e cas : un maximum de c/n valeurs sont comprises entre m et M : la qualité de la denrée est considérée comme acceptable.
 - 3^e cas : plus de c/n valeurs sont supérieures à M : la qualité est considérée insatisfaisante.

EXEMPLE

Numération des staphylocoques à coagulase positive dans les fromages au lait cru.

N = 5, c = 2, m = 10⁴ ufc/g, M = 10⁵ ufc/g

Qualité satisfaisante: tous les résultats sont inférieurs à 10⁴ ufc/g.

Qualité acceptable: un ou deux résultats sont compris entre 10⁴ et 10⁵ ufc/g.

Qualité insatisfaisante: plus de 2 valeurs sont supérieures à 10⁵ ufc/g.

Toxicologie alimentaire

Cette étude porte sur les substances toxiques exogènes introduites dans l'organisme avec la consommation d'aliments ou de boissons.

CHAPITRE XII - Méthodes d'étude en toxicologie

CHAPITRE XIII - Nature et origine des substances à potentialités toxiques dans les aliments

CHAPITRE XIV - L'action des toxiques

CHAPITRE XV - Toxicité des métaux et de l'arsenic

CHAPITRE XVI - Les pesticides ou produits antiparasitaires

CHAPITRE XVII - Les mycotoxines

CHAPITRE XVIII - Les adjuvants de l'alimentation animale et les médicaments vétérinaires

CHAPITRE XII

MÉTHODES D'ÉTUDE EN TOXICOLOGIE

1. Les tests toxicologiques

Les tests toxicologiques sont obligatoires dans le cadre de l'autorisation de mise sur le marché (AMM) :

- quand on introduit un nouveau produit sur le marché ;
- quand un produit déjà commercialisé est utilisé à d'autres fins ;
- quand on ajoute de nouveaux composants à d'anciennes formules.

Les tests sont réalisés par voie orale puisqu'il s'agit de composés ingérés *per os*. Ils sont effectués selon une chronologie établie.

1.1. Études relatives à la toxicité aiguë du produit

La substance à tester est administrée en une seule fois. Plusieurs doses sont testées en concentrations croissantes sur des groupes homogènes d'animaux. Ces études permettent de déterminer :

- les signes d'intoxication ;
- la dose létale 50 (qui provoque la mort de 50 % des animaux testés) ;
- les quantités limites à utiliser lors des autres études ;
- les organes cibles ;
- les modes d'action et les risques induits par des expositions excessives accidentelles.

1.2. Études relatives à la toxicité à doses répétées

1.2.1. Toxicité subaiguë ou subchronique

La substance est administrée de façon répétée, quotidienne ou périodique, pendant une durée qui n'excède pas quatre-vingt-dix jours. Les espèces, choisies en fonction des résultats d'études antérieures, sont des rongeurs (rats ou souris) et non rongeurs (chiens ou primates).

Les effets sur la croissance, le comportement et la mortalité de l'animal sont analysés. On procède à de nombreuses explorations biologiques. Certains animaux font l'objet d'une autopsie qui permet divers examens histo-pathologiques⁽¹⁾ d'organes et de tissus. Cette phase d'étude a pour but d'établir des relations entre la dose administrée et les effets toxiques observés, et donc d'estimer la dose sans effet qui servira à déterminer celle admissible chez l'homme.

1.2.2. Toxicité chronique

La période d'administration de la substance étudiée excède généralement quatre-vingt-dix jours ; elle s'étend jusqu'à dix-huit mois chez les rongeurs et parfois plus de deux ans chez les non rongeurs (chiens, porcs, primates) dont la durée de vie est plus longue. Ces études permettent de déterminer un niveau de dose sans effet toxique ou dose seuil et, pour les doses avec effets toxiques, le temps d'apparition de ceux-ci et leur réversibilité éventuelle.

1.3. Autres tests

1.3.1. Études métaboliques

Ces études, réalisées sur des espèces (rongeurs et non rongeurs) appropriées, conduisent à des données informatives sur les quantités absorbées, distribuées et stockées par l'organisme.

(1) histo : du grec *histos* = tissu

1.3.2. Études de cancérogenèse

Un processus de division cellulaire plus important que la normale peut conduire à l'apparition de tumeurs malignes dont certaines cellules sont ensuite susceptibles de migrer, donnant des métastases⁽¹⁾.

Une substance cancérogène peut induire, seule ou en association avec un autre produit :

- des tumeurs ;
- l'augmentation de la fréquence de certains types de tumeurs ;
- la diminution du temps de latence de tumeurs spontanées.

On classe les cancérogènes en trois catégories :

- les **cancérogènes complets** qui, par leur seule action, induisent des tumeurs ;
- les **cancérogènes incomplets** pour lesquels deux agents sont nécessaires, un initiateur et un promoteur. L'initiateur est un cancérogène complet dont les doses sont insuffisantes pour induire des tumeurs mais qui a créé des lésions du matériel génétique dans des cellules alors « initiées ». Ces lésions, non décelables, peuvent se révéler au contact, surtout répétitif, d'un agent promoteur. L'effet cancérogène va alors se développer ;
- les **cocancérogènes** qui ont un effet additif ou amplificateur **en association** avec une autre substance cancérogène.

Les études de cancérogenèse se font à long terme, dix-huit mois au moins, sur des animaux des deux sexes pour prendre en compte les différences imputables aux hormones sexuelles.

L'extrapolation à l'homme nécessite l'utilisation comparée de tous les résultats.

1.3.3. Études de toxicité génétique, c'est-à-dire de mutagenèse

Les possibilités du potentiel mutagène sont recherchées, par des techniques *in vitro* et *in vivo* :

- chez des bactéries (effets de mutations génétiques) ;
- dans des cellules de mammifères cultivées *in vitro* (dommages chromosomiques) ;
- dans des cellules eucaryotes cultivées *in vitro* et *in vivo*.

Lorsqu'il y a des dommages sur l'ADN ou une stimulation imprévue de synthèse par l'ADN, responsables d'apparition de métabolites actifs ou de transformation cellulaire, la substance étudiée est considérée comme **potentiellement cancérogène**.

1.3.4. Études de reproduction et de tératogénicité (aptitude à provoquer des malformations de l'embryon)

Elles fournissent des informations sur l'augmentation possible, au cours des générations, de la sensibilité de l'organisme à la substance étudiée.

Un **agent mutagène** va agir sur le développement des gamètes à partir du stade de la cellule germinale et provoquer une altération génétique héréditaire.

Un **agent tératogène** cause des dommages structurels et fonctionnels permanents au cours de l'embryogenèse, après les premiers clivages de l'embryon implanté. Deux espèces animales, choisies parmi souris, rat, lapin, hamster ou cobaye doivent servir à la détection de la tératogénèse.

Ces tests sont longs, coûteux et vivement critiqués par certains lorsqu'ils ont lieu sur des animaux. Ils conduisent à des mesures d'intensité toxicologique, instruments de détermination usuelle pour le toxicologue. Les tests de DL50, DE50 sont des tests réalisés *in vivo*.

2. Les paramètres significatifs

2.1. La DL50 ou dose létale 50

Elle donne une estimation statistique de la quantité de produit qui tue la moitié d'une population animale. Ce test fut mis au point en 1920 afin d'évaluer la toxicité de préparations pharmaceutiques.

2.2. La DE50 ou dose efficace 50

Elle est basée sur la recherche de la quantité de produit provoquant des effets nuisibles, mais non mortels, chez 50 % des individus d'une population animale.

2.3. La dose sans effet

Les résultats des études toxicologiques chroniques et subchroniques font l'objet d'études statistiques qui permettent de déterminer la dose sans effet exprimée en mg par kg de poids corporel par jour chez l'animal en expérience.

(1) métastase : apparition, en un point de l'organisme, d'un phénomène pathologique présent ailleurs.

2.4. La dose journalière admissible (DJA)

La DJA est usuellement rapportée au kilo de poids corporel. C'est la dose de la substance susceptible d'être absorbée en une journée et par kilo de poids corporel par un individu sans entraîner d'effets toxiques, même si l'absorption a lieu quotidiennement toute la vie.

On choisit en général l'espèce la plus sensible pour définir ainsi la dose journalière admissible chez l'animal. Pour extrapoler à l'homme et déterminer la dose journalière admissible (ou DJA) pour l'homme, on divise la dose sans effet pour l'animal par un facteur arbitraire de sécurité 100 (10 • 10) :

- 10 pour tenir compte de la différence de sensibilité entre espèces et de la synergie ou de l'antagonisme entre produits ;
- 10 pour tenir compte des variations individuelles : état physiologique, état de nutrition, état sanitaire. Ce facteur peut être de 1 000 pour les substances supposées plus toxiques.

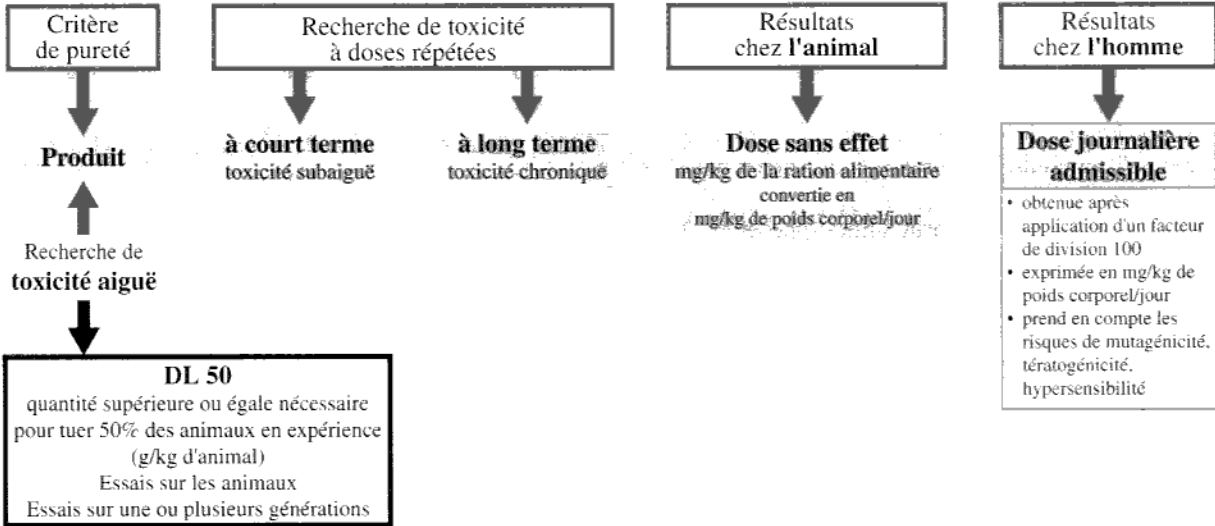


Fig. 1 – Les paramètres en toxicologie alimentaire

Cependant la sécurité absolue n'existe pas. Le poids de référence est de soixante kilos et se pose donc le problème du dépassement de la DJA chez les enfants souvent consommateurs excessifs de certaines productions agro-alimentaires. Il faut plutôt considérer la DJA comme la base d'un niveau d'ingestion en dessous duquel une sécurité relative est assurée. Pour les contaminants tels que les métaux lourds, on fait plutôt appel à la dose hebdomadaire admissible : DHA.

2.5. La limite maximale codex de résidus ou LMR

Elle est définie par le *Codex Alimentarius*, applicable pour les pesticides mais aussi les mycotoxines. La LMR est la concentration maximale d'un résidu autorisée légalement dans ou sur un produit alimentaire.

$$LMR = 1000 \frac{P}{C} DJA$$

P: poids du sujet en kg

C: moyenne de consommation quotidienne du produit alimentaire en g par personne.

Une LMR à la limite des possibilités de détermination par les méthodes analytiques est affectée par le *Codex Alimentarius* chaque fois que la présence du résidu dans un aliment est en contradiction avec les bonnes pratiques agricoles .

3. Principes généraux régissant l'évaluation toxicologique des additifs alimentaires

Si le besoin technologique ou économique d'un nouvel additif a été démontré, une évaluation toxicologique doit être faite. Elle concerne aussi des additifs consommés par l'homme pendant des années, qui n'ont pas semblé induire des risques pour la santé et dont on souhaite une nouvelle utilisation.

L'analyse toxicologique permet d'aborder l'évaluation de la sécurité d'emploi d'un additif alimentaire. Elle en est la première étape, fournissant des données qui seront ensuite interprétées.

Sont pris en compte :

- les données physico-chimiques propres à la substance ;
- sa structure chimique ;
- son mode de synthèse. Il aidera à préjuger des impuretés susceptibles de contaminer l'additif. Les textes réglementaires propres à l'utilisation des additifs précisent toujours les critères de pureté ;
- les méthodes d'analyse spécifique qui permet d'identifier le produit ou les méthodes de contrôle strict de son utilisation.

Les additifs font l'objet d'études complémentaires portant sur la digestion, l'absorption intestinale et l'induction de la biosynthèse dans les microsomes⁽¹⁾ hépatiques. Les enzymes induites dans le foie par l'arrivée du xénobiotique⁽²⁾ peuvent en effet détoxiquer ou transformer une substance protoxique en substance toxique.

Une étude toxicocinétique et une étude du métabolisme de l'additif et de sa capacité éventuelle à être allergisant sont réalisées.

Le Comité mixte OAA/OMS d'experts des additifs alimentaires a défini la DJA comme étant la quantité moyenne d'une substance, exprimée en mg/kg de poids corporel, qui peut être ingérée :

- chaque jour par le biais des aliments, pendant la vie entière ;
- sans qu'il en résulte des dommages manifestes pour la santé.

Une DJA « sans spécification de limite supérieure » sous-entend que la dose journalière totale de la substance utilisée pour obtenir les effets technologiques recherchés ne présente aucun risque pour la santé compte tenu des données toxicologiques.

Une DJA « temporaire », pour une période de validité de trois à cinq ans en général, est fixée de manière à compléter les données toxicologiques du moment, sachant que celles-ci, quoiqu'incomplètes, sont suffisantes pour exclure tout risque pour la santé.

(1) microsome : particule obtenue par homogénéisation du réticulum endoplasmique

(2) xénobiotique : étranger à la vie

CHAPITRE XIII

NATURE ET ORIGINE DES SUBSTANCES À POTENTIALITÉS TOXIQUES DANS LES ALIMENTS

1. Constituants naturels des aliments

1.1. Constituants à l'origine de manifestations neurologiques

Type de constituants	Principales substances	Manifestations	Origine
Neurotoxines de certains champignons	<ul style="list-style-type: none"> - Phallotoxines dont la phalloïdine créant une hypertrophie du foie. - Amatoxine (octapeptide bicyclique) mortelle à faible dose (7 mg contenue dans 50 g de champignons). - Muscarine (forte analogie structurale avec l'acétylcholine). - Substances hallucinogènes dont certaines ont une analogie structurale avec l'acide gamma amino butyrique du système nerveux. - Muscarine seule à forte concentration. 	<p>8 à 12 heures après ingestion ou plus de 24 heures.</p> <p>Intoxication phalloïdienne : vomissements, diarrhée, coma, mort.</p> <p>Intoxication de type muscaridien : ivresse, vomissements précoces, diarrhée.</p> <p>Intoxication de type muscaridien.</p>	<p>Amanite phalloïde, certaines lépiotes.</p> <p>Amanite panthère, amanite tue-mouche.</p> <p>Certains inocybes, certains clytocybes.</p>
Neurotoxines d'origine marine	<ul style="list-style-type: none"> - Tétrodotoxine, un des poisons les plus actifs : DL50 = 10 µg/kg chez la souris. - Dérivés de la saxitoxine : ciguatoxine, ciguaterine. - Saxitoxine (autrefois nommée mytilotoxine) et d'autres constituants formant une famille de 18 molécules proches, toutes thermorésistantes. La saxitoxine est la plus active : DL50 = 10 µg/kg chez la souris. Les toxines sont libérées lors de la lyse de micro-algues du phytoplancton dans l'hépatopancréas de coquillages qui ont filtré l'eau de mer contaminée. µLes mollusques bivalves transforment plus ou moins les toxines ; de ce fait il y a détoxification naturelle des coquillages après une certaine durée. - Brévétotoxines : NSP (de l'anglais <i>Neurotoxic Shellfish Poisoning</i>), neuf phycotoxines thermostables et liposolubles. <p>Ces phycotoxines paralysantes sont nommées improprement PSP (de l'anglais <i>Paralytic Shellfish Poisoning</i>).</p>	<p>Asphyxie due à la paralysie respiratoire dans 60 % des cas.</p> <p>Signes neurologiques et digestifs.</p> <p>Intoxications paralysantes par blocage des canaux sodium, ce qui interrompt la transmission nerveuse au niveau de la membrane postsynaptique. Les atteintes neuromusculaires conduisent à des engourdissements, des céphalées, vertiges, puis difficultés respiratoires graves.</p> <p>Intoxication neurologique (vertiges, ataxie) et syndrome digestif. Guérison sans séquelles après quelques jours.</p>	<p>Chair et surtout gonades des poissons tropicaux du type tétrodon, diodon.</p> <p>Poissons consommant les algues des récifs coralliens contaminées par les dinoflagellés.</p> <p>Coquillages parasités par des algues dinoflagellées, du genre <i>Alexandrium</i> pour la France. Ce phytoplancton toxigène prolifère dans l'eau de mer, en période estivale surtout. Ce phénomène est en expansion sur toutes les côtes de la planète du fait de la dissémination des algues par les ballasts des navires. La présence de phycotoxine entraîne l'interdiction de vente des coquillages.</p> <p>Coquillages contaminés par des algues dinoflagellées du genre <i>Gymnodinium breve</i>, Golfe du Mexique, Nouvelle-Zélande.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • neurotoxines à l'origine du favisme • neurotoxines à l'origine du neuropathisme 	<p>Analogues structuraux de l'acide glutamique.</p> <p>Dérivés d'acides aminés.</p>	<p>Neuromodulateurs.</p> <p>Lésions du système nerveux central.</p>	<p>Fève crue.</p> <p><i>Latyrus sativus</i> est une espèce végétale utilisée comme aliment dans certains pays en voie de développement. Trempage et cuisson éliminent ses propriétés toxiques mais entraînent une déperdition en vitamines. On recherche des variétés nouvelles dépourvues de toxicité.</p>

Type de constituants	Principales substances	Manifestations	Origine
Amines thermostables à activité biologique	<p>– Sérotonine.</p> <p>– Histamine.</p> <p>Dose toxique : 10 à 100 mg/kg.</p> <p>Intoxication légère : 5 à 10 mg/kg. L'histamine provient de l'histidine sous l'action d'enzymes tissulaires ou microbiennes. Elle se forme dans la chair de poissons à partir de certains pigments (hémoglobine, myoglobine, cytochrome C) par l'action de l'histidine-décarboxylase, présente en petite quantité. Cependant, elle est surtout produite par diverses bactéries lors du stockage à bord des bateaux ou dans les entrepôts quand les règles d'hygiène (refroidissement et congélation) ne sont pas respectées. La teneur maximale en histamine est limitée à 20 mg pour 100 g de thon par la Directive CE 91/493 reprise par l'arrêté du 29 décembre 1992 : sur 9 échantillons à analyser, 2 seulement peuvent dépasser 10 mg pour 100 g.</p>	<p>Neuromédiateur.</p> <p>Substance vasodilatatrice, provoquant la contraction des muscles lisses. Œdème, rougeur faciocervicale, maux de tête, accélération du rythme cardiaque apparaissent dans l'heure qui suit l'ingestion. À ces troubles vasomoteurs succèdent des troubles digestifs : vomissements, diarrhée, et enfin des troubles respiratoires chez les sujets sensibles. En général, l'ensemble des troubles disparaît en quelques heures. Chez les sujets très sensibles ou si la dose ingérée est massive, peuvent apparaître des accidents graves.</p>	<p>Certains fruits exotiques.</p> <p>Les muscles rouges des poissons pélagiques tels les thons rouges et en particulier l'espèce Listao d'assez petite taille. L'effet des traitements thermiques sur l'histamine est discutée : un traitement à 116 °C pendant 90 minutes est efficace mais il n'est atteint que lors d'appertisation de boîtes de grand format. Les nombreuses manipulations effectuées dans les conserveries peuvent favoriser la formation d'histamine. Les scombrides (thons, maquereaux) et les clupéidés (harengs, sardines, anchois...) qui ont subi un traitement de maturation enzymatique dans la saumure peuvent avoir des teneurs en histamine plus élevées mais ne dépassant pas 20 mg pour 100 g.</p>
Alcaloïdes comportant un hétérocycle azoté	<p>– 2 glycosides qui diffèrent par leur chaîne glucidique : – chaconines 60 % ; – solanines 40 %.</p> <p>L'aglycone est la salanidine, stérol portant en chaîne latérale un noyau de pyridine ; elle est libérée par la flore digestive et est responsable des troubles essentiels observés. Ces glycosides sont amers à une concentration de 15 à 20 mg pour 100 g de tubercule, seuil de toxicité.</p> <p>– Méthylxanthines : caféine, théophylline, théobromine.</p> <p>– Nombreuses autres substances.</p>	<p>Inhibiteurs de la choline estérase des tissus.</p> <p>Les symptômes sont : maux de tête, vomissements puis diarrhées, accompagnés de troubles neurologiques. Une des solanines est hyperadrénergique.</p> <p>Stimulants du système nerveux.</p>	<p>Pomme de terre verdie, germée ou meurtrie. Les alcaloïdes sont des facteurs de résistance de la plante. Ils ne sont dégradés par aucune technologie de cuisson ni par la déshydratation. Seul l'épluchage en élimine une large proportion.</p> <p>Boissons excitantes : café et thé, cacao, maté, kola.</p> <p>Nombreux végétaux.</p>
Substances cyanogènes	<p>Hétérosides cyanogénétiques libérant par hydrolyse :</p> <p>– l'acide cyanhydrique (Norme africaine FAO/OMS teneur en HCN total ≤ 2 mg/kg de poids sec d'aliment) ;</p> <p>– des thiocyanates.</p>	<p>Poison respiratoire.</p> <p>Goitrogène, cancérigène du tube digestif, toxicité neurologique.</p>	<p>– Graines de haricots (<i>Phaseolus lima</i> et <i>Phaseolus vulgaris</i>), pois, pois chiches (de 0,5 à 2 mg d'HCN libéré pour 100 g d'aliment) ;</p> <p>– graines de lin, de sorgho, de manioc, amandes* amères (de 55 à 250 mg d'HCN libérés par g d'aliment).</p> <p>Le rejet des eaux de cuisson permet d'éliminer la majeure partie des substances cyanogènes. Seul le manioc amer, utilisé pour la fabrication des féculles, nécessite des traitements plus intensifs.</p>

* amande (noyau des fruits)

1.2. Constituants provoquant des troubles endocriniens

Type de constituants	Principales substances	Manifestations	Origine
Constituants goitrogènes actifs sur la glande thyroïde	<p>– Thioglycosides appelés glucosino-lates dont les aglycones sont : – la goitrine ; – le thiocyanate ; – l'isothiocyanate ;</p> <p>– l'allyl.</p> <p>– Glycosides dont les aglycones sont des composés polyphénoliques.</p>	<p>Métabolisés en nitriles toxiques pour le foie et la vésicule biliaire.</p> <p>Stimulation de la production de TSH et hypertrophie de la glande thyroïde : ces composés diminuent la capture de l'iode par la glande thyroïde.</p> <p>Fixent l'iode.</p>	<p>Crucifères (choux, moutarde, radis, navets, colza) ; les glucosinolates restent dans la fraction protéique.</p> <p>Crucifères.</p> <p>Pigments et glucosides des végétaux.</p>
Constituants à effets œstrogéniques mineurs pour l'espèce humaine	Glycosides isoflavoniques : phyto-œstrogènes ayant des analogies structurales avec le 17- β œstradiol sécrété par les ovaires.	Troubles de la reproduction et hypertrophies d'organes. Femmes enceintes et nourrissons : contrôler l'apport en protéines de soja.	Largement répandus dans le monde végétal, graines de légumineuses, principalement le soja (surtout sous forme de jus) et les oléagineux.
Constituants agissant sur la fertilité, effets marqués lors de carence protéique.	Certains composés polyphénoliques.	Perte de poids et d'appétit. Hypofertilité de l'homme.	Gossypol du coton. Il donne avec la lysine des composés stables et diminue sa biodisponibilité.
Constituants provoquant un pseudo-hyperaldostérisme	Glycyrrhizine.	Hypertension avec hypokaliémie et rétention hydrosodée.	Extraits de réglisse, bonbons, boissons.

1.3. Constituants provoquant des troubles hématologiques

Nature des constituants	Principales substances	Manifestations	Origine
Constituants à action active sur la glande thyroïde sur le sang et l'hématopoïèse	Facteurs glycosidiques du favisme.	Provoquent une hémolyse aiguë chez les sujets présentant un déficit génétique en glucose-6-phosphate-déshydrogénase. Ce déficit est lié au sexe masculin et fréquent sur le pourtour méditerranéen.	Fèves (<i>Vicia faba</i>) Pois (<i>Pisum sativum</i>)

1.4. Constituants présentant des effets mutagènes

Nature des constituants	Principales substances	Manifestations	Origine
Constituants à action mutagène	<ul style="list-style-type: none"> - Safrol, estragol, méthyleugénol. - Hydrazines. - Polyphénols: flavonols, quinones et leurs précurseurs phénoliques. - Carbolines. 	<p>Tumeurs.</p> <p>Tumeurs.</p> <p>À dose élevée, ils induisent des lésions de l'ADN ; leurs métabolites quinoniques peuvent avoir des actions mutagènes. La plupart des polyphénols ont cependant une action anticancérogène <i>in vivo</i> vis-à-vis des hydrocarbures polycycliques et limitent la formation de nitrosamines cancérigènes.</p>	<p>Plantes aromatiques.</p> <p>Champignons.</p> <p>Divers végétaux.</p> <p>Divers végétaux.</p>

1.5. Constituants présentant des propriétés anti-enzymes

Nature des constituants	Principales substances	Manifestations	Origine
<p>Anti-enzymes thermolabiles :</p> <ul style="list-style-type: none"> • inhibiteurs de la trypsine • inhibiteurs de l'α-amylase 	Antitrypsine.	En complexant la trypsine, les anti-trypsines induisent une hyper-sécrétion de pancréatozime-cholecystokinine, une hypertrophie biliaire et pancréatique et provoquent une perte en azote exogène du fait de la diminution de la protéolyse intestinale. Ils bloquent l'hydrolyse de l'amidon. Leur action est limitée par celle de la sécrétion gastrique qui inactive ces inhibiteurs.	<p>Blanc d'œuf, graines de légumineuses, céréales, pommes de terre.</p> <p>Céréales (maïs, blé), graines de légumineuses, pommes de terre, gousses de haricot.</p>

1.6. Constituants présentant des propriétés anti-vitaminiques

Nature des constituants	Principales substances	Manifestations	Origine
Antivitaminiques thermolabiles :	<p>Antivitaminique B1 thiaminase.</p> <p>Antivitaminique PP.</p> <p>Antivitaminique B6.</p> <p>Antibiotine = avidine.</p> <p>Antivitaminique B12.</p> <p>Antivitaminique A.</p> <p>Antivitaminique E.</p> <p>Antivitaminique D.</p> <p>Antivitaminique C = ascorbate oxydase.</p>	<p>Scindent la vitamine en plusieurs parties inactives, la complexent ou entrent en compétition avec ses activités au sein du métabolisme. Conduisent donc à des carences vitaminiques de gravité variable.</p>	<p>Poissons crus, coquillages, crucifères, lin.</p> <p>Sorgho, maïs.</p> <p>Lin.</p> <p>Blanc d'œuf.</p> <p>Soja.</p> <p>Présence dans les graines de crucifères et de lin d'une lipoxydase détruisant le carotène.</p> <p>Graines de légumineuses qui contiennent une oxydase.</p> <p>Soja.</p> <p>Nombreux végétaux.</p>

1.7. Constituants provoquant des troubles de l'ingestion, de la digestion et de l'absorption : facteurs antinutritionnels

Nature des constituants	Principales substances	Manifestations	Origine
Constituants modifiant la prise alimentaire	<p>Lectines : composés glycoprotéiques ayant des affinités pour les récepteurs glucidiques de la muqueuse intestinale.</p> <p>Polyphénols, en particulier les tanins : se lient par leurs très nombreuses fonctions hydroxyles aux fonctions amides des protéines.</p> <p>Saponines, à goût amer.</p>	<p>Peuvent engendrer des diarrhées et des troubles de dénutrition. Possèdent également des propriétés hémagglutinantes, ce qui explique leur autre nom : hémagglutinines. Les différentes lectines ont des actions d'intensité différente. Celles du haricot possèdent une action antinutritionnelle forte.</p> <p>Dénaturent les glycoprotéines de la sécrétion salivaire et ont des propriétés astringentes donnant des sensations de sécheresse au niveau de la bouche. À faibles doses, stimulent l'appétit ; à fortes doses, l'inhibent.</p> <p>Ces substances peuvent se combiner aux protéines alimentaires et les rendre inattaquables par les enzymes digestives.</p> <p>Dérivés lipoglucidiques intervenant au niveau des récepteurs du goût.</p>	<p>Graines de légumineuses.</p> <p>Nombreux végétaux.</p> <p>Nombreuses plantes.</p>

Nature des constituants	Principales substances	Manifestations	Origine
Constituants complexant les minéraux de la ration	Acide oxalique	Forme des sels insolubles avec le calcium et le magnésium. Les aliments cités ci-contre ont un rapport acide oxalique/calcium supérieur à 3. Il faut, dans le cas d'ingestions importantes, compenser par des apports de calcium. 1mg de calcium neutralise 2,25 mg d'acide oxalique. Les autres aliments ont un rapport acide oxalique/calcium inférieur à 1 et un effet négligeable.	Rhubarbe : 250-1350 mg/100g Épinards : 320-1250 mg/100g Poirée ou bette : 330-900 mg/100g Oseille : 270-730 mg/100g Cacao : 300-900 mg/100g Thé : 300-2000 mg/100g Infusion de thé : 10-18 mg/100g Café : 50-150 mg/100g
	Acide phytique	Résulte de l'estérification de plusieurs fonctions alcool de l'inositol par l'acide phosphorique, se combine aux cations bivalents et trivalents : Ca ⁺⁺ , Zn ⁺⁺ , Fe ⁺⁺ , molybdène et les rend inabsorbables. L'acide phytique se trouve dans les végétaux sous la forme de phytates doubles de magnésium et de potassium.	Céréales : blé, seigle, riz, orge, avoine, maïs... en concentration de l'ordre de 0,9 à 1% Des phytases détruisant l'acide phytique sont également présentes dans les couches les plus externes des graines de céréales. L'addition de phytase à certains aliments à base de céréales est en cours de recherche.

1.8. Substances provoquant des diarrhées

Nature des constituants	Principales substances	Manifestations	Origine
Phycotoxines diarrhéiques <i>Diarrhetic Shellfish Poisoning</i>	Nombreuses substances, le squelette moléculaire commun est l'acide okadaïque, acide gras polycyclique.	Action analogue à celle de la toxine cholérique : intoxication diarrhéique, vomissements, douleurs abdominales, frissons et fièvre.	Mollusques bivalves contaminés par des dinoflagellés.

L'homme a su empiriquement éliminer les aliments naturellement dangereux, diminuer leurs effets toxiques par des traitements thermiques adaptés ou en associant judicieusement les aliments dans une ration. Les potentialités toxiques de certains composés naturels s'expriment cependant lorsque l'alimentation est déséquilibrée : cas des famines (par insuffisance de certaines productions par exemple). Les biotechnologies peuvent permettre de supprimer la production de toxines naturelles par des végétaux.

2. Substances toxiques d'origine non microbienne contaminant les aliments

On peut les définir comme des substances non intentionnellement ajoutées à la denrée alimentaire, mais présentes comme résidus de la production (culture, alimentation du bétail), de la fabrication, de la transformation, de la préparation, du traitement, du conditionnement et du stockage de la denrée ou provenant d'une contamination par l'environnement. « Leur teneur doit être maintenue aux niveaux les plus faibles que permettent raisonnablement les bonnes pratiques au cours de ces étapes » (règlement CEE N°315/93).

Origine des contaminations non microbiennes	Principaux exemples
Pollution accidentelle	Cas d'aliments accidentellement contaminés par des radioéléments tels le strontium 90, le césium 134 ou 137, l'iode 131... L'addition intentionnelle de ces radionucléides est interdite. L'UE fixe les niveaux maxima admissibles pour les denrées alimentaires en Bq/kg et Bq/L.
Pollution d'origine agricole	Résidus de produits phytosanitaires et de fertilisation : – nitrates utilisés comme engrais. La toxicité de l'ion nitrate est due à son aptitude à être réduit (en particulier par les micro-organismes) en nitrites beaucoup plus toxiques ; – résidus de pesticides, d'herbicides. Résidus d'adjuvants de l'alimentation animale, de médicaments vétérinaires et de leurs métabolites.
Pollution d'origine industrielle	Rejets dans l'eau, l'air et le sol (décharges) de métaux lourds, d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, dérivés fluorés, polychlorobiphényles, produits chimiques divers...
Contact des aliments avec certains matériaux :	
• d'emballage ; • de distribution.	Amiante, matières plastiques. Canalisation d'eau avec du plomb, en particulier les branchements domestiques.
Procédés de fabrication ou de préparations culinaires	Ustensiles étamés, vaisselles vernissées (métaux lourds). Traitements thermiques très poussés : – modification des protéines par formation de ponts covalents de type lysine-alanine, interactions protéines-glucides réducteurs par la réaction de Maillard ; – oxydation des acides gras insaturés en composés toxiques, au stade du raffinage lors de la désodorisation et surtout lors de l'utilisation ménagère ou commerciale des corps gras. Cette altération est d'autant plus importante que le degré d'insaturation est élevé. Les hydroperoxydes formés sont des initiateurs de l'altération. Plus de 500 composés résultant de cette altération, ont été inventoriés dont certains favorisent l'athérosclérose et d'autres peuvent être mutagènes ; – production de nitrosamines et de carbolines très toxiques ; – formation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

3. Substances toxiques dues à une contamination microbienne des aliments

Mode d'action des micro-organismes	Principaux exemples
Développement dans l'aliment d'une bactérie produisant une toxine	Toxines de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Clostridium perfringens A</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> (voir chapitre IV)
Développement dans l'aliment d'une moisissure produisant une mycotoxine	Production : - d'aflatoxines dans des aliments contaminés par <i>Aspergillus flavus</i> ; - de patuline (jus de fruits) ; - d'ochratoxines par <i>Aspergillus ochraceus</i> ou <i>Penicillium viridicatum</i> ; - trichothécènes par <i>Fusarium</i> (millet moisi).
Décarboxylation par les bactéries des acides aminés constituant les protéines avec formation d'amines, en particulier d'histamine, de tyramine	Fermentations accompagnant la fabrication des fromages, de la bière, de la choucroute. Altération des poissons (en particulier le thon, le maquereau, la sardine)

4. Substances vénéneuses

4.1. La réglementation

On se référera à l'article R 5149 du *Code de la santé publique* modifié par le décret du 29 février 1988 et complété par l'arrêté du 28 mars 1988. Les substances vénéneuses regroupent les substances dangereuses et les préparations (mélanges de deux ou de plusieurs substances) :

- entraînant des risques par inhalation, pénétration cutanée ou ingestion :
 - très toxiques,
 - toxiques,
 - nocives,
 - cancérogènes,
 - tératogènes,
 - mutagènes ;
- corrosives pour les tissus vivants ;
- irritantes, non corrosives mais inflammatoires.

Remplaçant les tableaux A, B, C, les listes I et II classent les substances vénéneuses.

La liste I regroupe les substances ou composés présentant les risques les plus élevés pour la santé.

Les contenants ou emballages des produits font l'objet d'un étiquetage spécifique réglementaire.

4.2. Cas des pesticides

De nombreux pesticides employés en agriculture sont inscrits dans les listes I et II. On les trouve dans de multiples organismes de vente et dans les exploitations agricoles sans qu'ils fassent l'objet de précautions suffisantes.

Les conditions de classement, d'étiquetage et d'emballage des préparations pesticides sont fixées par arrêté. Par exemple sont classés en 1989 :

- Ia : le parathion, l'endrine, la dieldrine, l'azinphos, le phosphore d'aluminium, l'oxyde d'éthylène ;
- Ib : l'aldrine, l'heptachlore ;
- Ic : le DDT, le lindane ;
- IIa : le 2-4 D ;
- IIb : le chlordane, le 2-4-5 T ;
- IIc : le malathion ;
- IId : le bromophos.

5. Étude particulière de quelques contaminants

5.1. Contamination des aliments par les dioxines

Les dioxines constituent une famille de 210 molécules : les dioxines ou dibenzodioxines polychlorées, les furanes ou dibenzofuranes polychlorés (PCDF) et les biphényles polychlorés (PCB). La plus connue et la plus toxique est la 2-3-7-8 PCDD tétrachlorodibenzodioxine, ou dioxine de Seveso qui sert de référence. Les dioxines ne présentent pas une importante toxicité aiguë ; la toxicité chronique à faible dose est préoccupante et ses effets sont mal connus. Chez l'animal, les dioxines se montrent cancérogènes, provoquant aussi des effets toxiques sur la reproduction, l'immunité et le système nerveux.

Chez l'homme, la 2-3-7-8 PCDD entraîne la chloracnée ; son effet cancérigène a été confirmé par l'Agence internationale de recherche sur le cancer. Les dioxines sont émises pour moitié par les rejets atmosphériques industriels et pour moitié par certains processus de combustion, dont l'incinération des déchets chlorés.

Ces composés sont très stables thermiquement et très peu biodégradables comme tous les composés organochlorés (la diminution de moitié des dioxines s'effectue en 8 ans).

D'autres part, ces composés sont liposolubles et donc, du fait de leur stabilité, ils s'accumulent tout au long de la chaîne alimentaire.

Les produits laitiers, par le biais des fourrages, et les produits de la pêche sont les plus contaminés. Pendant toute sa vie, l'homme est exposé à une trop forte ingestion de dioxines, pour 95 % par voie alimentaire.

Pour l'OMS, la DJA recommandée est de : 1 pg/kg poids corporel/jour, et le seuil maximal de 4 pg/kg poids corporel/jour (1 ng = 1 nanogramme = 10^{-9} g ; 1 pg = 1 picogramme = 10^{-12} g).

En 2000, le « panier moyen de la ménagère française » est proche de ces objectifs. Seul le lait de femme a une teneur préoccupante (en moyenne 16,5 pg/g de matière grasse, soit 50 pg/100 mL de lait). Pour les toxicologues, l'allaitement, parce qu'il est limité dans le temps, ne poserait pas de problème. Pour mieux apprécier le risque pour la santé publique en France, sont effectuées des études épidémiologiques ainsi que des mesures de dioxines dans les aliments animaux, le lait, le sang et le tissu adipeux dans la population générale et chez les sujets à exposition supposée. Les méthodes analytiques sont lourdes et coûteuses. Des valeurs guides concernent la teneur en TEQ (toxique équivalent ; 1 TEQ = 10^{-12} g) : < 3 TEQ / g de graisse dans le lait et les produits laitiers de grande consommation, les œufs et les ovoproduits, les viandes de ruminants, inférieure à 2 pour la volaille, inférieure à 6 pour le foie...

• Contamination particulière par les biphényles polychlorés (PCB)

Ces produits sont utilisés depuis cinquante ans comme plastifiants, solvants pour matières adhésives, peintures, encres, fluides échangeurs de chaleur. En France, leur usage n'est plus toléré que dans certains systèmes clos où ils peuvent être récupérés et, depuis 1975, leur utilisation est limitée en tant qu'isolants électriques dans les transformateurs ou les condensateurs et en tant que fluides caloporteurs.

Ces constituants ne sont pas détruits dans l'environnement et peu ou pas métabolisés ; depuis 1960, ils contaminent divers écosystèmes.

L'expérimentation animale a montré que si les PCB présentent peu de conséquences de toxicité aiguë, ils peuvent avoir des effets toxiques cumulatifs à long terme. Ils créent des atteintes du foie, de la rate, de l'hypoprotidémie et des dermatites. Ils peuvent avoir des effets mutagènes et donc, à doses élevées, être cancérigènes.

5.2. Les hydrocarbures halogénés ou composés organohalogénés

Ce sont le chloroforme, le bromoforme, le dichlorométhane (DCM), le dibromochlorométhane (DBCM) et autres solvants industriels et ménagers : dichloroéthane T1, tétrachloroéthylène T2, le trichloroéthylène T3...

Le DCM est un auxiliaire de fabrication, solvant d'extraction d'ingrédients alimentaires : huiles essentielles aromatiques, caféine.

Ces dérivés halogénés peuvent provoquer des troubles hépatiques, des irritations de la peau et des muqueuses. Certains d'entre eux sont capables de se combiner avec les acides aminés soufrés pour donner des produits toxiques.

Les résidus présents dans les aliments ou dérivés alimentaires traités sont négligeables si les techniques de fabrication sont bien conduites. Mais les hydrocarbures halogénés peuvent contaminer les milieux naturels.

Les HAP sont aussi des polluants organiques persistants (voir chapitre XIV, paragraphe 6.4).

5.3. Les nitrates et les nitrites

5.3.1. Les nitrates

La plupart des végétaux utilisent les nitrates pour effectuer la synthèse de leurs acides aminés. Les nitrates proviennent essentiellement des métabolismes bactériens, des effluents industriels et urbains et surtout de l'apport d'engrais azotés et des déjections des animaux d'élevage industriel.

L'apport en nitrates est aujourd'hui excessif et dépasse la capacité de fixation par les plantes ou le recyclage de l'azote réalisé par les bactéries dénitrifiantes. L'excès de nitrates se retrouve dans les eaux de ruissellement et les nappes phréatiques.

5.3.1.1. Ingestion de nitrates

Les nitrates peuvent provenir de la pollution de l'eau et des légumes dans lesquels ils s'accumulent normalement en faible quantité avant d'être transformés en protides. Cette quantité s'élève lors d'une utilisation excessive d'engrais nitraté ou lors de certains modes de culture (excès de lisier⁽¹⁾).

Tous les végétaux accumulent les nitrates mais particulièrement les épinards, bettes, racines de betteraves rouges, courgettes, radis, carottes et salades (surtout les laitues) cultivés en serre en dehors de la période normale de croissance. La concentration est plus forte dans les pétioles⁽²⁾ des épinards et la partie blanche des bettes que dans les limbes⁽³⁾, parties vertes de ces plantes.

(1) lisier : mélange des urines et des excréments des animaux

(2) pétiole : partie rétrécie reliant le limbe d'une feuille à la tige ; (3) limbe : partie élargie de la feuille

L'accumulation de nitrates dans une plante traduit un excès d'absorption par rapport à l'utilisation.

Différents facteurs interviennent :

- d'ordre génétique (différences variétales) ;
- d'ordre climatique (intensité lumineuse et température) ;
- d'ordre agronomique (forme et quantité d'engrais azotés, équilibres entre les différents composants de la fertilisation).

Une meilleure connaissance de ces facteurs et la recherche de nouvelles techniques devraient permettre de limiter l'apport de nitrates.

Les méthodes de l'agriculture biologique diminuent souvent de 30 à 50 % les nitrates contenus dans les légumes.

Le blanchiment à l'eau des légumes limite leur teneur en nitrates. Ces derniers peuvent corroder les boîtes de conserve par dissolution de l'étain ou du fer-blanc ; les résines protectrices recouvrant l'intérieur des boîtes doivent donc être particulièrement résistantes.

La réglementation française limite la teneur en nitrates de l'eau potable et celle des aliments pour bébés : 50 mg/kg de produit.

Les nitrates peuvent enfin être ajoutés aux aliments comme additifs conservateurs. Dans les produits de charcuterie et de salaison, ils ont aussi pour rôle de transformer la myoglobine en nitrosomyoglobine de belle couleur rose. Par ailleurs, les produits formés donnent une certaine saveur. Mais surtout ils sont bactériostatiques : ils inhibent la formation de la toxine de *Clostridium botulinum* et ils empêchent la multiplication des bactéries du genre *Clostridium*.

Le lait des bovins est enrichi en ces bactéries par l'alimentation moderne à base d'ensilage. *Clostridium tyrobutyricum* est responsable du gonflement anormal des fromages. De nombreux pays, mais non l'Italie, la Grèce et la France, autorisent l'utilisation de nitrates, peu coûteux, dans la fabrication des fromages affinés pour éviter cet inconvénient.

5.3.1.2. Effets des nitrates

Les nitrates ont été utilisés comme médicaments à partir du XVII^e siècle en tant que diurétiques, puis pour lutter contre le manque de potassium mais aussi pour leurs effets vasomoteurs sous forme de trinitrine pour combattre l'angine de poitrine.

L'ion nitrate est stable, peu réactif. Une grande partie des nitrates ingérés est absorbée au niveau de l'intestin et éliminée par voie urinaire.

5.3.2. Transformation des nitrates en nitrites

La transformation des nitrates en nitrites est catalysée par une enzyme : la nitrate-réductase produite par les végétaux et par les micro-organismes contaminant les végétaux, responsables de la maturation des produits de salaison, ou contenus dans la flore buccale ou intestinale.

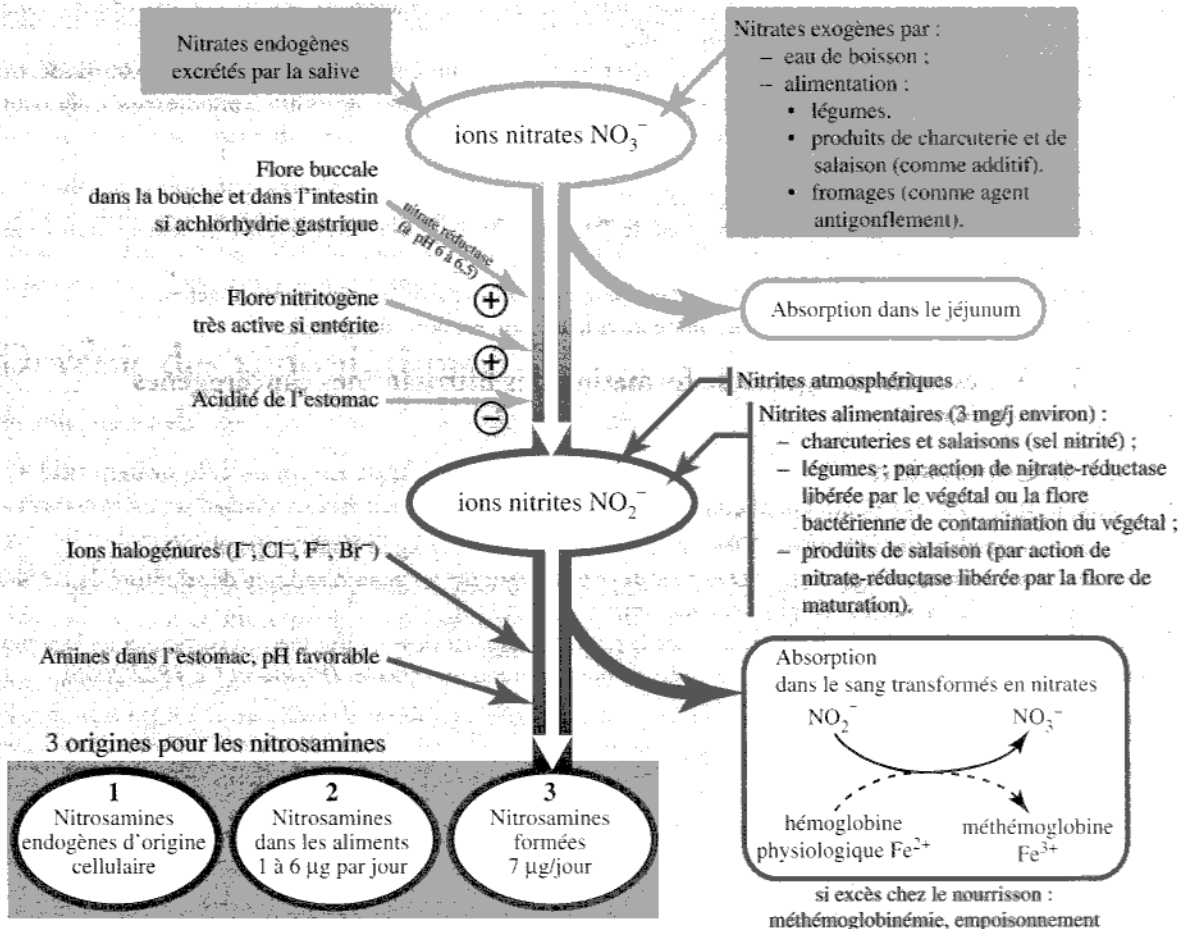


Fig. 1 – Nitrates et nitrites

REMARQUES

Quelle que soit la quantité de nitrates ingérés, l'homme en synthétise quotidiennement en quantité variable : 100 mg en moyenne. Cette biosynthèse des nitrates se fait à partir de l'arginine transformée en citrulline et monoxyde d'azote par les cellules, en particulier celles de l'endothélium vasculaire, et surtout les macrophages. Cette synthèse est exacerbée lors de syndromes infectieux (ce qui favoriserait l'épisode méthémoglobine-diarrhée du nourrisson) et lors d'activités physiques.

Les nitrates sont excrétés par la sueur, la salive et surtout les reins, et sécrétés par la voie intestinale basse. À ce niveau, les bactéries de l'iléon terminal et du côlon les transforment en dérivés aminés ensuite réabsorbés et intégrés par le foie en acides aminés.

Les nitrates exogènes s'ajoutent dans l'organisme et subissent le même circuit que les nitrates endogènes.

5.3.2.1. L'utilisation des nitrites dans l'industrie alimentaire

L'ion nitrite est très instable, très réactif et peut se transformer en d'autres composés tel le monoxyde d'azote NO.

NO inhibe les micro-organismes anaérobies, en particulier *Clostridium botulinum* et forme avec la myoglobine des pigments rouges ou roses stables, en oxydant le Fe^{2+} en Fe^{3+} . Cette propriété est utilisée dans les industries de charcuterie et de salaison.

5.3.2.2. Les nitrites responsables de méthémoglobinémie

Les nitrites agissent directement sur l'hémoglobine. L'hémoglobine fonctionnelle comme pigment respiratoire doit contenir le fer à l'état d'ion ferreux Fe^{2+} . Lorsque le fer est à l'état ferrique Fe^{3+} , l'hémoglobine est sous forme de méthémoglobine. La teneur habituelle du sang en méthémoglobine est de 0,8 % ; des systèmes enzymatiques réducteurs du fer régulent son taux.

L'organisme humain possède des mécanismes de régulation efficaces :

- acidité de l'estomac ;
- catalases qui oxydent les nitrites en nitrates ;
- des systèmes enzymatiques contenus dans les globules rouges, l'un utilise le glutathion comme réducteur et deux méthémoglobulines-réductases dont l'une fonctionne avec $NADH + H^+$; l'autre, peu active dans les conditions normales, est fonctionnelle avec $NADPH + H^+$ en présence d'un transporteur d'électrons, fonction que possède le bleu de méthylène utilisé comme agent curatif de la méthémoglobinémie.

Cependant, cette régulation peut être dépassée par l'apport de toxiques méthémoglobinisants tels les dérivés aromatiques nitrés, médicaments nitrés ou nitrités, parasitocides (nitrofuranes, nitro-imidazoles), insecticides (parathion), fongicides (nitrophénol...), herbicides (dérivés du dinitrophénol).

Lorsque le taux de méthémoglobine atteint 10 %, le sujet présente des symptômes de cyanose ; au-delà de 60 %, des troubles de conscience apparaissent ; à 70 %, l'intoxication peut être mortelle. Un traitement consiste à induire par l'acide ascorbique la réduction du fer pour obtenir l'hémoglobine.

Les nourrissons sont particulièrement exposés à cette pathologie car :

- leur estomac sécrète peu d'acide chlorhydrique ;
- ils conservent jusqu'à l'âge de trois mois près de 70 % de l'hémoglobine fœtale plus facilement transformée en méthémoglobine ;
- leur intestin peut être contaminé par des souches d'entérobactéries particulièrement nitritogènes.

Tout apport supplémentaire de nitrates par les aliments et la boisson est donc dangereux.

5.3.2.3. Les nitrites, agents de formation des nitrosamines cancérigènes

On se reportera à la *figure 1*.

5.3.3. Conclusion

La DJA des nitrites est de 0,133 mg/kg de poids corporel.

Les nitrates étant générateurs de nitrites, l'OMS a fixé leur DJA à 3,65 mg/kg de poids corporel.

Le *Code des bonnes pratiques des produits de salaison et de charcuterie* limite les doses d'addition de sel nitrité de 1,2 % à 2 % (sel nitrité : 99,4 % de sel + 0,6 % de nitrite de sodium).

L'Union européenne met en œuvre la surveillance de la teneur en nitrates dans les légumes, en particulier les légumes verts à feuilles, et souhaite l'application de meilleurs codes de bonnes pratiques agricole. (*Règlement CE 1822/2005*).

CHAPITRE XIV

L'ACTION DES TOXIQUES

1. Les voies de pénétration dans l'organisme

Trois voies de pénétration sont possibles :

- la **voie cutanée** qui est fonction de l'affinité du produit pour la peau ;
- la **voie respiratoire** avec les effets les plus rapidement redoutables ;
- la **voie digestive** phénomène plus chronique.

La voie digestive fera l'objet de cette étude.

2. Pénétration dans l'organisme

• La phase d'exposition

Elle détermine la concentration nécessaire du toxique pour qu'il fasse effet. Le contrôle de la sécurité de l'environnement, le respect de l'hygiène et de la sécurité alimentaire en industrie agro-alimentaire sont donc essentiels.

Les habitudes alimentaires conditionnent la quantité ingérée d'un toxique donné.

• Résorption

La plupart des toxiques sont absorbés par diffusion passive. Les membranes biologiques étant lipophiles, plus le degré de lipophilie du toxique est important, mieux il traverse les membranes.

• Rôle de la flore intestinale

La flore intestinale peut métaboliser des composés xénobiotiques. Elle effectue leur hydrolyse et leur réduction ; elle s'oppose alors à l'action oxydante du foie. On assiste à une complémentarité métabolique positive ou, dans certains cas, à un antagonisme métabolique qui peut être négatif.

3. Devenir des xénobiotiques

Il existe trois possibilités.

• Élimination plus ou moins rapide

La détoxification se fait par hydrolyse, oxydation puis conjugaison, principalement dans le foie. Les produits obtenus sont moins toxiques, plus hydrosolubles ; leur élimination est donc possible par les voies respiratoires, digestive, urinaire.

• Séquestration physique de produits non biodégradables ou de leurs métabolites

Cette séquestration est effectuée par le tissu adipeux lorsque le toxique est lipophile : DDT, biphényles polyhalogénés (PCB : polychlorobiphényle), dioxines, certains plastifiants. Elle peut l'être par d'autres tissus : par exemple, le plomb et le strontium se fixent sur les os.

Si le bilan devient négatif, le tissu libère le toxique qui migre vers des tissus plus fragiles tels le système nerveux. Si la quantité de toxique libéré est élevée, il y a alors possibilité d'une intoxication aiguë. On retrouve ainsi le DDT, vers 1965, ou la dioxine, en 2000, en forte quantité dans le lait maternel.

• Formation par l'organisme de composés plus toxiques : la biotoxification

La biotoxification est étudiée plus en détail dans le paragraphe suivant.

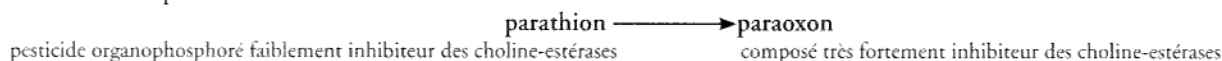
4. Étude de la biotoxification

On appelle biotoxification la formation de métabolites plus toxiques que la molécule initiale. L'activation métabolique est assurée par des systèmes enzymatiques. Le cytochrome P450, monoxygénase du foie porté par les microsomes, active l'oxygène et catalyse l'oxydation de substrats lipophiles tels les lipides et les xénobiotiques.

Ces réactions peuvent conduire à une détoxification ou à la formation de métabolites plus toxiques que le substrat (activation toxique). Elles peuvent, selon le substrat, revêtir plusieurs formes.

4.1. La désulfuration oxydative

C'est le cas du parathion



4.2. L'époxydation

Les époxydes sont électrophiles et se lient de façon covalente aux biomolécules (ADN, ARN, protéines) et peuvent être allergènes, cytotoxiques ou cancérigènes. Le safrole, le méthyleugénol et l'estragole contenus dans les aromates subissent cette époxydation.

Les pesticides organochlorés tels le DDT sont activés par époxydation.

Les époxydes eux-mêmes peuvent subir des transformations

ultérieures. Le benzopyrène synthétisé lors de cuissons trop vives est transformé en époxyde puis en diol, composé lui-même à nouveau époxydé. Le diolépoxyde obtenu est très réactif vis-à-vis des groupements thiols des protéines.

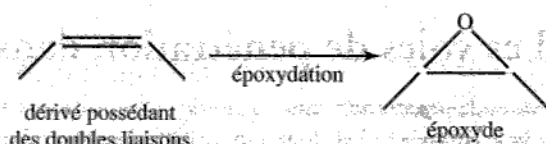


Fig. 1 – Réaction d'époxydation

4.3. L'activation des nitrosamines

Le radical formé est un radical libre ou un puissant agent d'alkylation RCH_2^+ , très réactif avec l'ADN et les protéines. Les nitrosamines sont, de ce fait, des agents mutagènes sévères, provoquant des cancers de l'estomac et du foie chez de nombreuses espèces animales.

4.4. L'hydroxylation des amines



5. Interaction avec les molécules du tissu cible

À la phase toxicocinétique : transport, métabolisme, excrétion possible du xénobiotique, fait suite la phase toxodynamique qui comprend principalement les réactions du toxique avec les molécules du tissu cible.

5.1. Formation d'une liaison réversible (non covalente)

C'est le cas des toxiques intervenant dans la neurotransmission soit comme antagonistes tels les pesticides organophosphorés et les carbamates, soit des composés interférant dans l'action hormonale. Ces toxiques sont responsables d'effets aigus ou d'effets à court terme.

5.2. Action basée sur une liaison irréversible covalente avec des molécules chimiquement réactives

Les toxiques, fortement électrophiles, exercent leur action sur les doubles liaisons des lipides et au niveau des sites nucléophiles⁽¹⁾ ($-NH_2$, $-SH$). Ils forment des liaisons covalentes stables avec ces sites d'action, et produisent ainsi leurs effets : nécroses cellulaires (par atteinte des lipides et des protéines), sensibilisation allergique, mutagenèse, cancérogenèse, tératogenèse.

La solidité de ces liaisons irréversibles explique que les dommages persistent après la suppression du toxique. Un apport complémentaire du toxique peut produire des effets cumulatifs.

L'étude de la toxicité est rendue difficile par la lenteur d'apparition des manifestations pathologiques.

(1) Site nucléophile donneur de doublet d'électrons à un réactif électrophile, accepteur de doublet d'électrons.

5.2.1. Les porteurs de sites nucléophiles

5.2.1.1. Les protéines

Certains acides aminés contenus dans les protéines tels histidine, cystéine, lysine, tyrosine, tryptophane, méthionine... sont riches en doublets électroniques libres et réagissent particulièrement avec les agents chimiques cancérigènes.

5.2.1.2. Les acides nucléiques par le biais des bases azotées

Il peut aussi se faire qu'un toxique de structure stéréochimique ou d'une taille proche de la base vienne s'insérer sur l'acide nucléique dont les fonctions seront alors altérées.

5.2.2. Les agents toxiques

Un bon nombre de toxiques doivent avoir subi une activation préalable pour se lier à des sites nucléophiles.

C'est ainsi que les hydrocarbures, l'aflatoxine B₁ et les oléfines halogénées telles que le chlorure de vinyle (monomère) sont transformés en époxydes. Les amines aromatiques, les dérivés azoïques après hydroxylation et activation par des transferts de groupements réactifs forment des liaisons covalentes avec les biomolécules.

Les nitrosamines activées ont une action alkylante par le biais du radical libre R-CH₂[•] (1).

5.3. Étude particulière des radicaux libres oxygénés

5.3.1. Formation de radicaux libres oxygénés

Les radicaux libres sont des structures chimiques neutres ou chargées portant un électron non apparié.

Ce sont des intermédiaires dans de nombreuses réactions normales de l'organisme dans lesquelles leur formation reste contrôlée. En quantités anormalement élevées, ils sont toxiques.

De nombreux toxiques sont activés en radicaux libres tels les hydrocarbures halogénés.

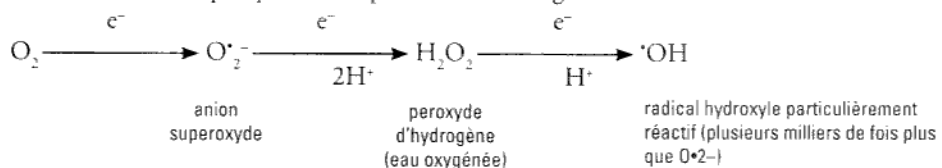
Des radicaux libres se forment en quantité anormale lors de l'arrivée dans l'organisme de dérivés organonitrés, benzopyrène, de certains herbicides Diquat® et Paraquat®, de polluants atmosphériques tels amiante, ozone, NO, NO₂...

Les sources de radicaux libres oxygénés peuvent être endogènes.

L'anion superoxyde O₂^{•-} cytotoxique provient de réactions biochimiques normales du métabolisme et de l'action bactéricide des leucocytes. L'anion superoxyde le plus abondamment produit est le moins réactif. Par ailleurs, les cellules disposent d'enzymes, les **superoxydes-dismutases**, qui transforment l'anion superoxyde en eau oxygénée.

La **catalase** et, surtout, la **glutathion-peroxydase** à sélénium, détruisent ce composé en deux composés non toxiques : eau et oxygène.

Dans certains cas, des réactions monoélectroniques peuvent se produire dans l'organisme.



La première de ces réactions peut être le résultat de l'action de diverses enzymes :

- NADPH-oxydase lors de phagocytose, O₂^{•-} permet la formation de H₂O₂ puis d'hypochlorite ClO⁻ à rôle bactéricide ;
- cytochrome-oxydase lors de respiration cellulaire. Quelques pour cent d'O₂ sont déviés, une quantité notable de O₂^{•-} se forme alors ;
- xanthine-oxydase lors de l'oxydation des purines, produits finals de la dégradation des acides nucléiques ;
- cytochrome P450 du foie lors de détoxication ;
- autres enzymes de détoxication.

Ces réactions sont lentes, exigent l'intervention d'un ion métallique, le fer le plus souvent.

La réaction d'Haber Weiss précise le bilan des réactions de l'interconversion des espèces radicalaires de l'oxygène.



Les radicaux libres sont responsables du vieillissement des cellules et de nécrose cellulaire. Leur taux est en excès lors de pathologies avec stress oxydatif, telles qu'inflammations chroniques, infarctus, insuffisance rénale chronique, hémodialyse, transplantations d'organes, anémies hémolytiques, cirrhose éthylique, diabète, maladie d'Alzheimer... Les sources exogènes ajoutent à la formation de radicaux libres oxygénés. Les **sources exogènes** sont l'oxygène hyperbare, les radiations (par leurs produits de radiolyse) et les toxiques, médicamenteux ou non.

(1) • : symbole pour radical libre

5.3.2. Effets des radicaux libres oxygénés

Les réactions radicalaires sont très rapides, efficaces : l'orbitale périphérique étant incomplète, le rapprochement des molécules est facilité et il n'y a pas de rupture de liaison, ce qui rend les radicaux libres très agressifs.

Les lipides des membranes cellulaires sont la cible privilégiée des radicaux libres.

Les acides gras polyinsaturés sont transformés par lipidoperoxydation en radicaux peroxydes, ROO[•], en hydroxypéroxydes ROOH et même en alcoyles RO[•] qui altèrent les membranes biologiques et modifient la formation des prostaglandines (activateurs intracellulaires). Les peroxydes, en particulier, fragilisent la chaîne carbonée. Il se forme des produits de coupure très réactifs qui modifient les propriétés des protéines des biomolécules.

Ces produits de coupure sont des aldéhydes, cétones, alcools, éthers, acides et alcanes.

Le dialdéhyde malonique, en particulier, transforme l'apolipoprotéine B100 des LDL (lipoprotéines de basse densité, vectrices du cholestérol aux cellules). L'apolipoprotéine B modifiée n'est plus reconnue par le récepteur membranaire spécifique, mais par un autre récepteur, présent, lui, à la surface des macrophages. Elle induit l'accumulation d'esters du cholestérol dans ces cellules qui deviennent « spumeuses », à l'origine des « stries lipidiques » dans la paroi des vaisseaux. C'est la première étape réversible du processus d'athérogenèse.

Les radicaux libres créent des ponts covalents entre les acides gras polyinsaturés (AGPI), AGPI et cholestérol, AGPI et protéines. Les lipides membranaires sont alors désorganisés, de même que les propriétés des protéines membranaires à rôle de récepteurs, d'enzymes ou de transporteurs. Enfin, le cholestérol membranaire est transformé en oxystérols, composants athérogènes, immunomodulateurs et à effets cyostatiques.

Les radicaux libres peuvent aussi créer la peroxydation d'acides aminés de certaines protéines, modifiant leur structure, leur activité et les rendant plus fragiles, surtout celles qui portent un groupement thiol (SH). De nombreuses enzymes sont ainsi oxydées et inactivées, ce qui perturbe le métabolisme cellulaire.

La peroxydation de l'ADN a lieu sur les bases puriques et pyrimidiques conduisant à des anomalies dans la transmission du message génétique, mais aussi à des coupures de chaînes et à des pontages anormaux.

Les radicaux libres interviennent dans de nombreux processus pathologiques allant jusqu'à la cancérogenèse, lorsque les enzymes (dismutase, catalase, glutathion-peroxydase) qui les contrôlent sont dépassées.

6. Risque mutagène et cancérogène

6.1. Relations entre mutagenèse et cancérogenèse

Les études ont montré que les mêmes composés chimiques ou les mêmes métabolites sont à la fois mutagènes et cancérogènes. Un grand nombre de cancers sont liés à des anomalies de structure chromosomique, même si la mutagénicité n'est pas la seule cause de la cancérogenèse.

6.2. Produits naturellement présents dans les aliments

Les plantes synthétisent contre leurs prédateurs (bactéries, champignons, insectes ou animaux) des produits toxiques.

6.2.1. Safrole, estragole, méthyleugénol

Ils sont présents dans de nombreuses plantes aromatiques, ont des propriétés mutagènes et cancérogènes. Le safrole est métabolisé en époxyde capable de réagir avec les macromolécules biologiques, l'ADN en particulier.

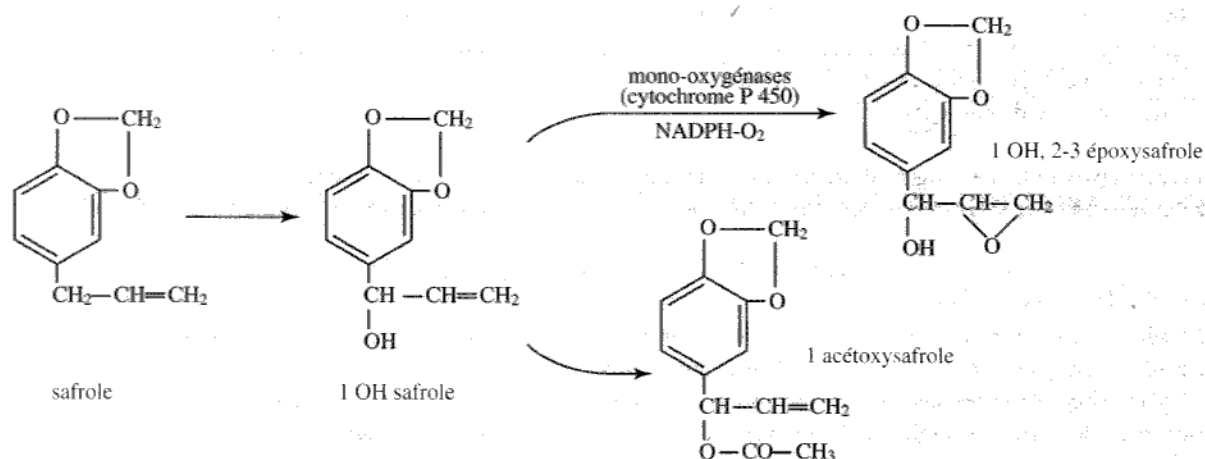


Fig. 2 – Activation du safrole

6.2.2. Les hydrazines

Elles sont présentes dans les champignons (tel l'agaric champêtre commun), sont transformées en radicaux libres fortement cancérigènes.

6.2.3. Les furocoumarines

Comme les dérivés du psoralène, elles sont largement répandues dans la famille des ombellifères (céleri, persil) mais aussi dans les essences d'agrumes (bergamote et citron). En présence de rayons ultraviolets, le psoralène fournit des radicaux libres.

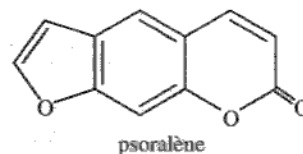


Fig. 3 – Structure chimique d'une furocoumarine

6.2.4. Les polyphénols

Ils sont largement répandus dans les végétaux. La consommation est proche de 1 g par jour chez l'homme. Certains peuvent être, à court terme, des agents mutagènes, phénomène montré par de nombreux tests.

6.2.5. Les quinones et leurs précurseurs phénoliques

Ils se trouvent en grande quantité dans la nourriture humaine. Très électrophiles, ils conduisent à la formation de radicaux réagissant facilement avec l'ADN. Les quinones de la rhubarbe, les dérivés du catéchole, caféine, théobromine, sont mutagènes et potentialisent les effets d'autres agents mutagènes.

Cependant, les résultats expérimentaux sont contradictoires : les flavonols, polyphénols du groupe des 4-oxoflavonoïdes, contenus dans les fruits (principalement les agrumes) et les légumes (surtout les choux) ont un rôle important dans la prévention des maladies cardiovasculaires et des cancers en réagissant avec les radicaux libres oxygénés. L'un de ces flavonols, la quercétine, a donné des résultats positifs de cancérogenèse chez le rat ; elle est mutagène chez certaines salmonelles.

6.3. Les carbolines (amines hétérocycliques)

Ces composés sont produits naturellement dans certains aliments ou synthétisés au cours de technologies alimentaires. Les premières carbolines connues furent celles du monde végétal. Certains alcaloïdes des végétaux à rôle hallucinogène sont des carbolines.

Ce sont des molécules pyrido-indoliques proches du tryptophane.

Les carbolines ont une grande affinité pour les médiateurs du système nerveux. Leurs rôles sont divers, en particulier elles sont des inhibiteurs enzymatiques.

Les recherches ont montré que bien des familles végétales renferment des carbolines simples ou complexes (le dernier cycle pyridimique porte alors de nombreux cycles). Non seulement les végétaux tropicaux, analysés jusque là pour leur intérêt pharmacologique et sociologique, contiennent des carbolines mais aussi les fruits et légumes usuels européens.

Les organismes des animaux, leurs excréments et leurs productions contiennent des carbolines dont la formation dérive du métabolisme du tryptophane.

Certaines carbolines sont produites dans les aliments fermentés, donc sont d'origine microbienne.

Les carbolines trouvées dans le lait et les fromages semblent avoir pour origine la flore du rumen.

Le chauffage intense (appelé pyrolyse), le grillage, le rôtissage à 300 °C, le barbecue et même l'ébullition très prolongée des acides aminés et des protéines provoquent la formation de carbolines.

Les carbolines semblent participer au pouvoir mutagène des produits alimentaires, sans cependant en être le responsable ou l'agent unique.

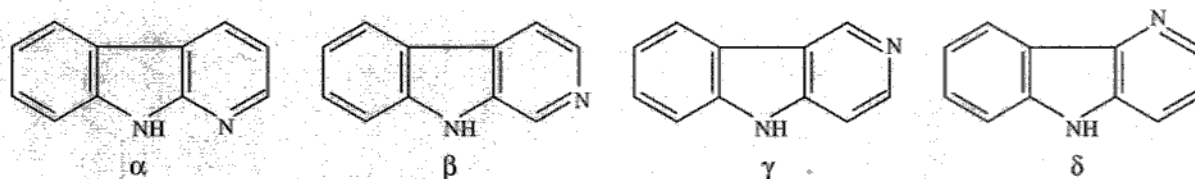


Fig. 4 – Structure chimique des carbolines

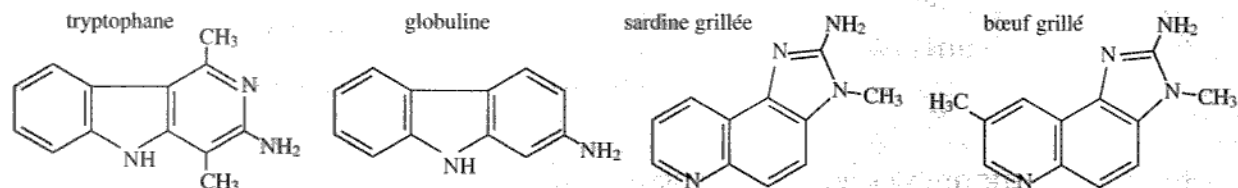
Le métabolisme des carbolines rejoint les mécanismes communs à de nombreuses molécules polycycliques contaminant les aliments. La plupart d'entre elles subissent une hydroxylation sur la fonction amine et sont ensuite rendues solubles par glucurono et sulfo conjugaison puis éliminées par les voies rénale ou biliaire. Mais certaines carbolines peuvent subir la transformation en nitrosamines ; certains métabolites N-hydroxyles sont mutagènes.

6.4. Mutagènes et cancérigènes se formant au cours de cuissons trop vives ou de traitements thermiques trop poussés ou mal conduits

Le paragraphe précédent portant sur les carbolines évoque ce problème. Il semble que chaque fois que l'on soumet un aliment à des traitements thermiques sévères, il se forme des dérivés aux propriétés mutagènes et cancérigènes. On a isolé des produits de pyrolyse obtenus à partir du tryptophane mais aussi d'autres acides aminés (acide glutamique, lysine et phénylalanine).

Les protéines du soja, de la sardine et du bœuf, après pyrolyse, les sucres après caramélisation excessive et le café torréfié sans précaution donnent des composés fortement mutagènes.

Produits obtenus à partir de :



Certains pyrolysats mutagènes sont dérivés d'acides aminés comme le tryptophane, d'autres de protéines comme la globuline, d'autres de complexes protéiques dont la formule n'a pas encore été déterminée.

Fig. 5 – Carbolines et composés mutagènes formés par cuisson à haute température (plus de 250 °C)

La pyrolyse ou la combustion incomplète des matières organiques (volcans, industries, pollution...) conduit aussi à la formation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) comme le benzopyrène.

Tous les processus de combustions spontanées ou nécessaires à l'activité humaine génèrent des HAP. Les analyses montrent que l'éventualité d'une contamination préalable des denrées alimentaires brutes existe. Les traitements thermiques sévères des denrées elles-mêmes ou l'accumulation dans certaines espèces animales (mollusques...) sont à l'origine de la contamination des aliments par les HAP, en particulier benzopyrène et diméthylanthracène, les plus toxiques.

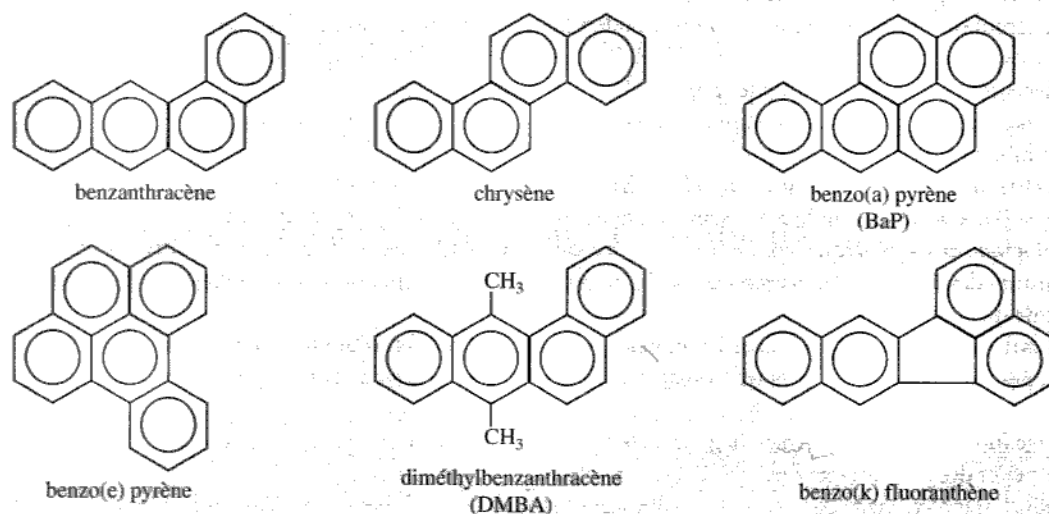


Fig. 6 – Structure de quelques HAP

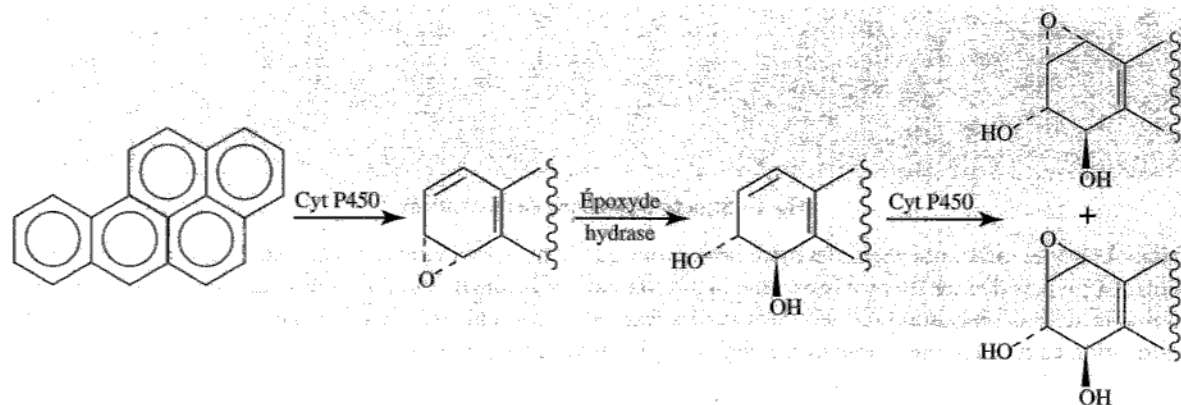


Fig. 7 – Activation du BaP en 9-10 époxydes 7-8 trans diols, composé mutagène et cancérigène

Les expériences au cours de la pyrolyse des glucides, des protéines et des lipides, montrent que les lipides, surtout les stérols, sont les meilleurs précurseurs des HAP. La température de chauffage a un rôle déterminant. La source d'énergie utilisée (gaz, fuel, charbon, barbecue...) crée des fumées au contact de l'aliment et ajoute une contamination de surface. Le barbecue mal conduit peut multiplier par 10 la dose d'HAP moyenne quotidienne ingérée.

L'isolement des sources de chaleur par rapport à l'enceinte recevant l'aliment élimine les risques d'inflammation et diminue la pyrosynthèse des HAP. Le contrôle du chauffage est essentiel pour limiter la genèse des HAP. Les analyses de matières grasses commercialisées ont montré que leur teneur en HAP est faible du fait du contrôle des traitements technologiques faisant intervenir la chaleur. La contamination de corps gras par les HAP est due à leur surchauffe.

Les HAP sont lipophiles, leurs voies métaboliques dans l'organisme sont variées : détoxification conduisant à la formation de métabolites ultimes dépourvus de toute mutagénicité mais aussi activation sous forme d'époxydes capables de réagir avec des acides nucléiques. Il semble que la toxicité des HAP, en affectant de nombreuses bases, soit due à un codage défectueux d'une grande partie de la molécule d'ADN. Certains sont extrêmement toxiques à des doses infimes.

La cancérigénicité par voie orale des HAP induit des tumeurs du tractus digestif, des glandes mammaires et de l'appareil respiratoire des animaux.

6.5. Produits mutagènes et cancérigènes provenant de contaminations par les micro-organismes

Ce sont les mycotoxines provenant de la contamination par les moisissures, en particulier l'aflatoxine B₁ présente dans les arachides, et la patuline présente dans les fruits.

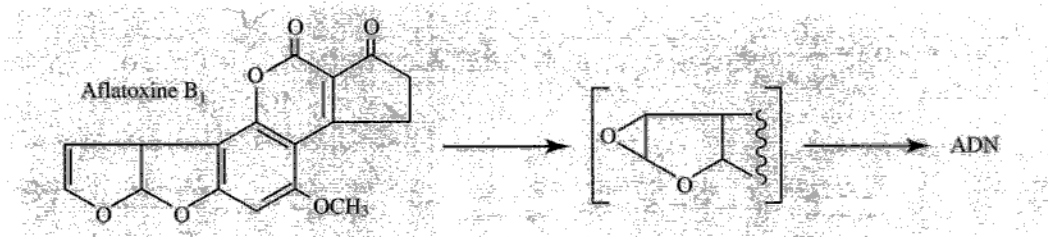


Fig. 8 – Activation métabolique de l'aflatoxine B₁

L'époxyde formé réagit avec l'ADN. Il est fortement mutagène et l'aflatoxine fortement cancérigène.

6.6. Les nitrosamines formées par les micro-organismes dans les aliments mais aussi dans le tube digestif

6.6.1. Les précurseurs des nitrosamines

6.6.1.1. Les dérivés aminés

Ce sont :

- les acides aminés contenus dans les aliments tels que proline et hydroxyproline du collagène par exemple ;
- les amines formées lors de la cuisson par l'hydrolyse du collagène, les amines formées lors de la friture ou apportées par l'ajout culinaire d'épices, de poivre...

Les viandes contiennent de la diéthylamine, de la sarcosine, de la pyrrolidine. La pipéridine peut être ajoutée avec le poivre mais, comme la pyrrolidine, elle peut aussi provenir de la dégradation bactérienne de la proline et de la lysine.

Les poissons contiennent de la diméthylamine et de la triméthylamine obtenues par la transformation bactérienne de l'oxyde de triméthylamine.

Les résidus de pesticides peuvent contenir des amines. Enfin, certains médicaments sont à base d'amines secondaires ou tertiaires.

6.6.1.2. L'ion nitrite

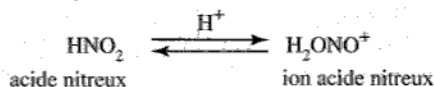
L'ion nitrite est obtenu par **réduction des nitrates** sous l'action de la nitrate-réductase des végétaux ou des bactéries, de la flore buccale à pH proche de la neutralité (6 à 6,5).

Il n'y a jamais de mélange tout préparé de sel nitrité et de poivre en vue de son utilisation en salaison et charcuterie. Grâce à de bonnes pratiques en matière de charcuterie, les apports directs en nitrites restent faibles.

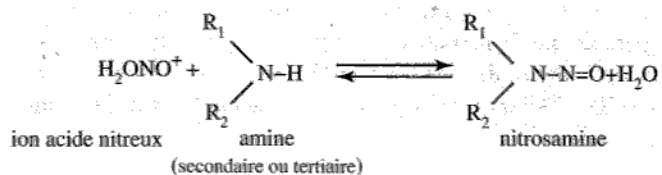
6.6.2. La réaction de nitrosation

Elle entraîne la formation de composés N-nitrosés: les nitrosamines.

- Étape intermédiaire formant l'agent nitrosant

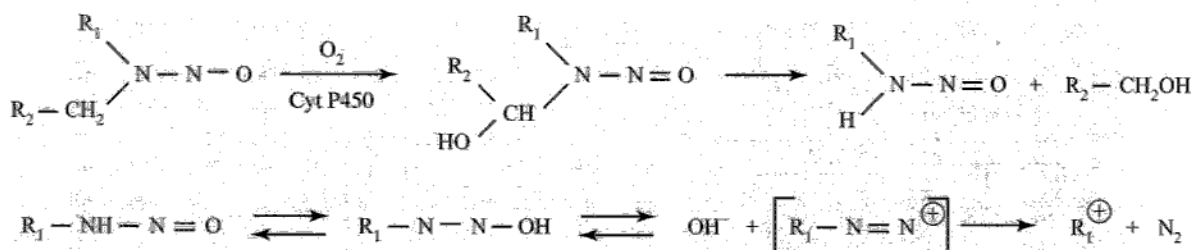


- Formation de la nitrosamine



La nitrosamine formée est oxydée par le cytochrome P450 du foie puis subit une activation en radical très réactif avec l'ADN. Cette formation se fait par une étape intermédiaire, génératrice d'halogénure de nitrosyle O=N-X, X ions chlore, iode, fluor, brome...

- Activation de la nitrosamine



Le radical formé est un puissant agent d'alcoylation.

- Facteurs influençant la formation des nitrosamines

Certains facteurs influencent la formation des nitrosamines dans les aliments et *in vivo* :

- le pH: le pH optimal de la réaction est compris entre 3 et 3,5, il favorise la réaction spontanée. Le pH optimal de la formation de nitrosamines est celui de l'estomac. Plus une amine est basique, plus la réaction se fait;
- les modifications physiques induites par les traitements technologiques;
- la cuisson est une étape favorable;
- la congélation de l'eau favorise une concentration optimale du nitrite et de l'amine soluble et augmente la vitesse de nitrosation. Cette augmentation a lieu jusqu'à ce que toute l'eau soit congelée.

- Action de composés chimiques

Certains composés chimiques favorisent la formation de nitrosamines:

- les halogènes, chlorures, fluorures, iodures, bromures. Il est interdit d'utiliser le sel iodé ou fluoré pour le saumurage des produits de salaison et de charcuterie;
- les citrates utilisés comme additifs;
- les thiocyanates éliminés en grande quantité par la salive des fumeurs.

L'acide L-ascorbique et les tanins polyphénols ont une action inhibitrice sur la formation de nitrosamines. L'acide L-ascorbique est un additif utilisé fréquemment, en particulier dans les produits de salaison.

- Action des micro-organismes réducteurs des nitrates

Ces bactéries favorisent la réaction de nitrosation à un pH qui ne permet pas la réaction spontanée entre les nitrites et les amines. Cette action est facilitée par l'entreposage à température ambiante.

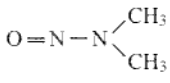
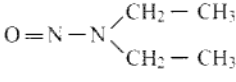
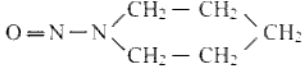
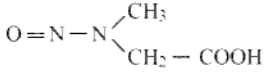
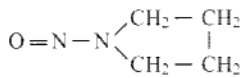
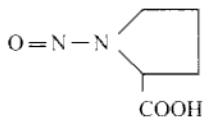
Composés N-nitrosés détectés	Produits analysés en ppb (1 µg/kg de produit)
Diméthyl-nitrosamine 	bière, vin, fromages, poissons salés (400 à 1 000 poissons), mollusques et crustacés, viandes, charcuterie fumée
Diéthyl-nitrosamine 	poissons, fromages, viandes, bière, whisky
Nitrosopipéridine 	viandes et produits carnés épicés
Nitrososarcosine 	viandes, charcuterie
Nitrosopyrrolidine 	viandes 2, fromages 1, bacon 1,5 à 2, bacon frit (4 fois plus), foie de porc cru et cuit, poissons 1 à 6, graisse cuite
Nitrosoproline 	produits carnés, bacon frit

Tableau 1 – Composés N-nitrosés dans les aliments

6.7. Les agents antimutagènes

Dans la nourriture existent naturellement des agents antimutagènes mais l'organisme dispose de mécanismes de protection.

Les agents liposolubles sont essentiellement actifs sur la peroxydation lipidique. La vitamine E limite la peroxydation des acides gras polyinsaturés et des lipoprotéines membranaires par effet protecteur vis-à-vis de ROO[•].

Les carotènes et les caroténoïdes ont un rôle de prévention de la cancérogenèse par leur structure isoprénique. Le β-carotène en particulier inactif les radicaux libres et renforce les défenses immunitaires. Il semble agir au niveau de plusieurs étapes du processus de cancérogenèse.

Le sélénium en tant qu'activateur de la glutathion-péroxydase a une activité anticancérogène. Cette enzyme dégrade tous les peroxydes de l'organisme : eau oxygénée ou peroxydes des lipoprotéines membranaires.

La superoxyde-dismutase des mitochondries est formée de quatre sous-unités contenant chacune un atome de manganèse.

La superoxyde-dismutase cytosolique est formée de deux sous-unités contenant chacune un atome de cuivre et de zinc.

La superoxyde-dismutase extracellulaire est formée de quatre sous-unités contenant cuivre et zinc ; elle est présente dans les liquides biologiques (plasma, lymph, liquide synovial) et surtout les tissus dans lesquels elle est liée aux protéoglycans des membranes cellulaires et de la matrice interstitielle. L'action catalytique de ces trois formes de superoxyde-dismutase est liée à la présence des oligoéléments. Ces métalloprotéines sont indispensables à la vie.

L'acide L-ascorbique a un effet protecteur contre [•]OH, inhibiteur de la formation des nitrosamines et un effet anticancérogène vis-à-vis du benzo-a-pyrène et des cancers induits par les radiations. D'autres molécules à effets antioxydants sont des agents antimutagènes : cystéine, homocystéine, glutathion (anticancérogène vis-à-vis de l'aflatoxine), taurine, un grand nombre de composés soufrés des végétaux (en particulier dans la famille des crucifères tels les choux), métallothionéines⁽¹⁾ transporteurs du zinc. Les bioflavonoïdes, polyphénols des végétaux, piègent les radicaux libres oxygénés.

L'état nutritionnel du sujet est donc un facteur important dans la lutte contre la toxicité des xénobiotiques. La dénutrition protéique déprime ces réactions. Les protéines alimentaires semblent limiter l'activation métabolique des procarcinogènes.

TOXICITÉ DES MÉTAUX ET DE L'ARSENIC

1. Le plomb (Pb)

Ce métal fut utilisé dès 4000 av. J.-C. pour la fabrication de statuettes, pour celle de monnaie et de revêtements étanches et pour la réalisation de soudures. Le plomb est aussi, avec l'arsenic, un des poisons les plus anciennement connus, responsable d'intoxications aiguës mais surtout chroniques : le saturnisme.

Le plomb est facilement attaqué, en présence d'oxygène, par des acides faibles tels que l'acide carbonique dissous dans les eaux dites douces ou agressives des pays à sol granitique ou gréseux, mais aussi les acides des légumes et des fruits et même les acides gras libérés lors du rancissement des lipides.

Le plomb est absorbé en compétition avec le calcium par des mécanismes assez proches. Il se fixe sur les groupements thiols de deux enzymes essentielles à la biosynthèse de l'hémoglobine. L'accumulation de leur substrat sert au dépistage du saturnisme professionnel.

Le plomb est absorbé par voie pulmonaire mais surtout par voie digestive. Il agit au niveau du système nerveux périphérique, réduit la vitesse de conduction des nerfs centraux et peut créer des encéphalopathies graves.

Sont responsables de toxicité par le plomb : les conduites et les contenants avec soudure au plomb ou avec un alliage au plomb, l'eau agressive collectée par des tuyaux en plomb, les vins surbouchés par des capsules en plomb-étain (cette pratique est interdite depuis le 31 décembre 1991), les aliments acides entreposés dans des récipients en céramique. Par contre, le carburant au plomb ne semble pas entraîner de risques.

Des dispositions réglementaires limitent les apports alimentaires en plomb, par exemple dans les eaux destinées à l'alimentation ($\leq 10 \mu\text{g/L}$).

Le plomb, métal ubiquitaire à concentration de 16 ppm (ppm : mg/kg) dans les sols, oligoélément indispensable sans doute, ne semble pas actuellement poser de problèmes graves au niveau alimentaire sauf lors de retombées atmosphériques liées à la pollution industrielle (par exemple : lait de vache pollué par la proximité d'usines autour des pâturages). La DHA du plomb est de 1 500 μg . Rognons et huîtres, aliments les plus contaminés, contiennent, respectivement, jusqu'à 500 μg et 250 μg de plomb par kg.

2. Le cadmium (Cd)

Ce métal est présent dans le sol à concentration inférieure à 0,2 ppm. Comme le plomb, le cadmium a un pourcentage d'absorption pulmonaire bien supérieure à l'absorption digestive. De ce fait, les intoxications aiguës graves par inhalation sont à craindre. La pollution est en relation avec l'utilisation d'engrais phosphatés impurs, les techniques industrielles ou les décharges de boues résiduaires. Le cadmium dissous est fortement diffusible donc fort contaminant. La maladie « Itai-Itai » a frappé au Japon des sujets vivant en aval d'une usine qui contaminait les eaux de boisson et les aliments, légumes, céréales et poissons.

L'absorption intestinale du cadmium est faible, diminuée par le calcium et l'acide phytique.

Cependant, le cadmium ingéré est probablement la source majeure du cadmium accumulé par l'homme durant sa vie. On retrouve 90 % à 95 % du cadmium ingéré dans les fèces.

Le cadmium absorbé est véhiculé par une métallothionéine qui peut transporter 11 % de son poids de cadmium ou de zinc, du fait de ses nombreux groupements thiols. La synthèse de cette protéine est inductible par le cadmium, le zinc ou par d'autres métaux. L'hémoglobine et les protéines sériques transportent aussi le cadmium du fait de son affinité pour les groupements thiols. Le foie et les reins surtout accumulent le cadmium ; à long terme le foie relâche lentement le cadmium, de même que les autres organes d'accumulation (pancréas, glandes salivaires, testicules) vers les reins.

La concentration de cadmium hépatique et rénale au niveau du cortex augmente au cours de la vie du fait de son faible taux d'excrétion. Au-delà de $200 \cdot 10^{-6} \text{g}$ de cadmium par gramme de tissu frais de rein, se produit une néphropathie particulière avec apparition dans les urines de protéines de faible poids moléculaire.

Au cours d'intoxications poussées, s'ajoute une ostéomalacie très douloureuse au niveau du bassin et des membres inférieurs se manifestant lors de déficience en calcium et vitamine D. Enfin, les recherches portent sur la potentialité d'hypertension et de cancérogenèse du cadmium.

Le cadmium perturbe l'absorption du fer et du cuivre en entrant en compétition avec leurs transporteurs. Il se substitue au calcium et modifie la perméabilité membranaire, cellulaire et intracellulaire.

À l'intérieur de la cellule, du fait de sa forte affinité pour les groupements thiols, il inhibe les enzymes contenant du zinc et perturbe la fonction respiratoire. Le cadmium inhibe l'ARN polymérase et perturbe la synthèse protéique. Enfin, le cadmium se lie à l'ADN du noyau.

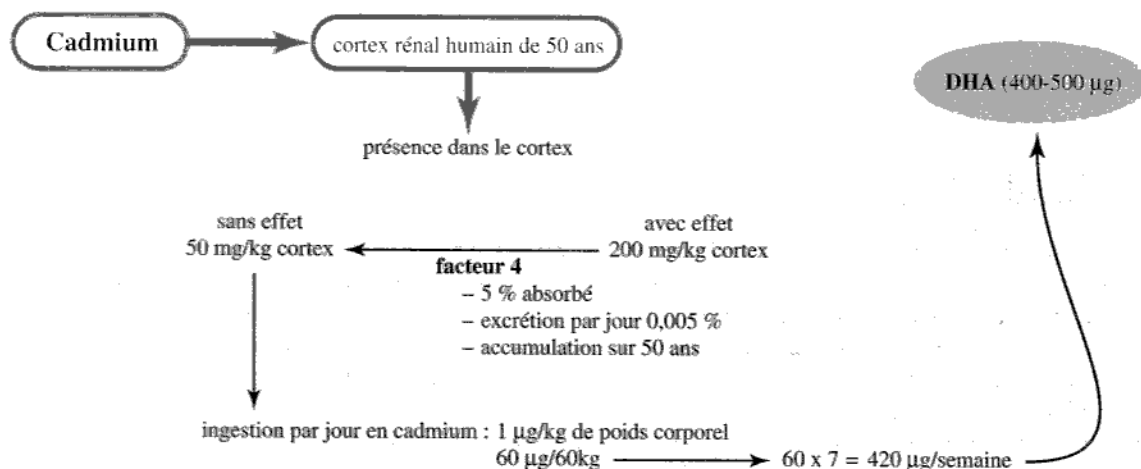


Fig. 1 – Établissement de la dose hebdomadaire admissible
(valeurs obtenues à partir d'accidents survenus à l'homme au Japon)

Les aliments pouvant être mis en cause sont les végétaux mais aussi le foie et le rein des animaux terrestres. Ces deux organes peuvent être contaminés, surtout chez le cheval (animal abattu tardivement), d'autant que le cadmium combiné à la métallothionéine dans les tissus est mieux absorbé.

Les aliments d'origine aquatique: mollusques, crustacés (surtout dans les parties brunes de la chair) et plus rarement les poissons peuvent être à l'origine d'intoxications par le cadmium. Le fer galvanisé de certaines conduites d'eau potable ou les pièces métalliques de certains distributeurs de boisson sont à contrôler, surtout avec les eaux douces. Enfin, les poteries et céramiques artisanales colorées peuvent libérer du cadmium au contact d'aliments acides.

La barrière placentaire protège efficacement le fœtus contre la pénétration du cadmium, mais des effets tératogènes ont été observés chez l'animal et chez l'homme.

Le cadmium s'accumule dans l'organisme, or les industries produisent toujours plus de ce métal et entraînent un doublement de la concentration de cadmium dans la chaîne alimentaire tous les vingt ans. L'eau destinée à l'alimentation doit contenir moins de $5 \mu\text{g}$ de cadmium par litre (Directive CEE 80/777 et décret du 3 janvier 1989).

3. Le mercure (Hg)

Comme le plomb et le cadmium, le mercure a un effet cumulatif. Sa toxicité à long terme s'exerce au niveau du rein et du système nerveux.

5 à 15 % de la quantité ingérée du mercure ionisé est absorbée.

Le mercure est transformé facilement en dérivés organomercuriels, en particulier en méthylmercure, forme très toxique.

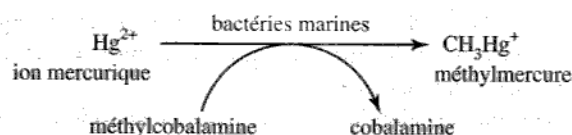


Fig. 2 – Formation du méthylmercure, produit neurotoxique, par les bactéries marines

Le méthylmercure est absorbé à 80-100 %. Il se fixe sur les groupements thiols de la cystéine ou du glutathion qui le véhiculent dans l'organisme. Il est liposoluble, métabolisé très lentement : la liaison méthylmercure est stable et la protéine qui assure la détoxification des ions mercuriques n'a que peu d'affinité pour ce composé.

De ce fait, le méthylmercure s'accumule dans les membranes cellulaires et la myéline ; la rupture libre des radicaux libres CH_3^+ alcoylants qui détruisent les acides gras polyinsaturés. L'administration de sélénium et de tocophérols antagonistes des radicaux libres corrige quelque peu la désagrégation membranaire.

Le méthylmercure perturbe la synthèse protéique au niveau du réticulum endoplasmique rugueux et les flux métaboliques dans les axones. En effet, c'est un inhibiteur enzymatique puissant de l'ATPase de l'enzyme synthétisant l'acide γ -aminobutyrique (GABA), médiateur chimique du système nerveux. Il est aussi inhibiteur de la synthèse d'enzymes intervenant dans la division et la différenciation cellulaires.

La catastrophe de Minamata au Japon a permis de découvrir l'accumulation dans l'environnement de méthylmercure liposoluble : en 1953, 54 sujets sont décédés suite à une intoxication massive par le mercure due à l'ingestion de poisson. La naissance de 22 enfants malformés mit en évidence le passage transplacentaire du méthylmercure et son effet tératogène.

Dans certains pays, les pesticides organomercuriels peuvent souiller les végétaux ou les œufs.

La FAO/OMS a proposé une dose hebdomadaire tolérable de 0,3 mg dont deux tiers au plus sous forme organique.

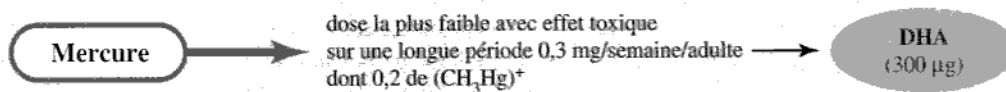


Fig. 3 – Dose hebdomadaire admissible pour le mercure

La CEE a limité à $1\mu\text{g/L}$ le mercure dans les eaux destinées à l'alimentation humaine.

Les teneurs moyennes en mercure peuvent atteindre $10\mu\text{g/kg}$ pour les abats, $40\mu\text{g}$ pour les huîtres et crustacés et $160\mu\text{g}$ pour certains poissons. Pour ces derniers, la surveillance des espèces de poissons doit aussi porter sur les formes chimiques du mercure.

4. Le chrome (Cr)

Le chrome est présent à une concentration proche de $0,1\text{ mg/kg}$ de matière sèche dans les tissus animaux ou végétaux.

Le chrome trivalent migre peu à peu à partir des aciers inoxydables, en quantité très inférieure aux limites fixées : 60 mg/kg .

Par contre, les dérivés hexavalents du chrome : acide chromique, chromates et bichromates sont très dangereux car allergènes et cancérogènes.

Les boîtes de conserve en fer chromé ne posent pas de problème car :

- les quantités de chrome VI présentes à la surface sont infimes ;
- les fers chromés sont toujours utilisés vernis ;
- le chrome VI passant éventuellement dans le contenu est réduit en chrome III non toxique.

La CEE a fixé la limite en chrome VI à $0,05\text{ mg/kg}$ d'aliment.

La teneur en chrome total de l'eau potable doit être inférieure à $50\mu\text{g/L}$.

5. L'étain (Sb)

Peu représenté dans la nature, ce métal est essentiellement apporté par les soudures des boîtes de conserve en fer blanc. Le vernissage, ainsi que la soudure électrique des boîtes, limitent donc ce phénomène.

L'étain a la réputation d'être un métal peu toxique. Cependant, des effets de l'étain minéral ont été observés chez les animaux :

- il perturbe le métabolisme des oligoéléments, du zinc surtout, du magnésium et du calcium, en liaison sans doute avec une diminution de l'absorption intestinale ;
- il se fixe aux groupements thiols, bloquant certaines enzymes.

L'étain est très faiblement absorbé.

Les composés dialcoylés de l'étain, liposolubles, utilisés dans l'industrie (par exemple comme stabilisants du PVC, polychlorure de vinyle) sont peu toxiques et migrent peu dans l'aliment.

Le *Codex Alimentarius* limite à 250 mg/kg , l'étain minéral des fruits et des légumes traités, et à 150 mg/kg l'étain des bouillons et consommés, ainsi que des jus de fruits.

6. L'aluminium (Al)

Il est tellement répandu que notre ration quotidienne en apporte au moins 10 mg par jour. Les casseroles, les emballages métalliques augmentent cette dose.

Léger, de densité 2,7 (7,8 pour le fer), très malléable, non sujet à des phénomènes électrochimiques comme l'est le fer-blanc, l'aluminium donne des sels incolores et inoffensifs. À l'air, une pellicule d'oxyde d'aluminium se forme à la surface du métal : elle peut donner des sels au contact des aliments. L'arrêté du 27 août 1987 relatif aux matériaux et objets en aluminium ou en ses alliages en contact avec des denrées, produits et boissons alimentaires précise la pureté ou la composition. Il rend obligatoire une opération finale de colmatage, sauf si l'aluminium a été renforcé par une couche créée par anodisation ou par un film de vernis.

Peu coûteux, l'aluminium, matériau alimentaire de pureté 99,5 %, est de plus en plus utilisé.

Les feuilles d'aluminium de 5 µm à 200 µm sont utilisées en l'état ou, le plus souvent, dans des matériaux complexes. Les boîtes en aluminium peuvent être embouties. L'aluminium est utilisé en alliage pour augmenter ses qualités mécaniques : avec du magnésium pour les batteries de cuisine ou du manganèse pour les boîtes de conserve.

Les dérivés de l'aluminium sont en principe mal absorbés. Cependant, les analyses chez les sujets malades rénaux dialysés, traités par 2 g de gel d'alumine (oxyde d'aluminium), ont montré la neurotoxicité de ce dérivé pouvant aller jusqu'à des phénomènes de démence. Des recherches plus poussées impliquent plutôt la richesse de l'eau de dialyse en ce métal. Ceci a conduit la CEE à fixer à 200 µg/L la concentration limite de l'eau de boisson, éventuellement purifiée par le sulfate d'aluminium qui est ensuite éliminé par floculation. Il semble, en effet, que la perméabilité du tube digestif à l'aluminium augmente avec de fortes doses de ce métal et avec une élévation du taux de parathormone (trouble présenté par les insuffisants rénaux chroniques).

7. L'arsenic (As)

Il existe dans les sols à une concentration de 1 à 2 ppm. Ses formes minérales sont très solubles. Les intoxications criminelles à l'anhydride arsénieux As_2O_3 révélèrent la toxicité de l'arsenic. Les intoxications chroniques à l'arsenic se manifestent par des ulcérations de la peau aux endroits de contact et par une névrite⁽¹⁾ périphérique sensitive douloureuse. De plus, l'action cancérigène de l'arsenic fait l'objet d'études importantes ; l'arsenic est métabolisé en dérivés inorganiques et en composés organiques dont les effets sont recherchés.

L'arsenic existe dans les aliments sous diverses formes qui ont une toxicité différente.

8. Conclusion

La non-toxicité présumée de bon nombre de substances comme celle de l'aluminium peut donc être remise en cause. La toxicologie analytique voit son rôle amplifié et reprecisé. La Direction générale de la Santé a publié, en 1995, les résultats d'une étude réalisée en 1992 et portant sur le plomb, le cadmium et le mercure. Le plomb subit une équidispersion dans l'écosystème ; le cadmium et le mercure font l'objet d'une bioconcentration dans le milieu marin et les produits de la mer (le mercure, en particulier, se concentre dans les poissons et surtout le thon). L'étude montre que la probabilité d'atteindre ou de dépasser la DHA, semble très réduite (apport moyen pour un adulte entre le tiers et la moitié de la DHA) sauf habitudes alimentaires particulières entraînant une alimentation non variée.

Le règlement CE n°466/2001 du 8 mars 2001 publié au *JO CE* du 16 mars 2001 applicable en 2002 précise les teneurs maximales en métaux lourds :

- pour le plomb, treize catégories d'aliments sont visées dont le lait, certains produits pédiatriques, la viande et les abats, certains produits de la pêche, les fruits et légumes, les jus de fruits, les huiles et matières grasses, les céréales, les vins ;
- pour le cadmium, onze catégories d'aliments ;
- pour le mercure, certains produits de la pêche.

(1) Névrite : lésion inflammatoire d'un nerf

CHAPITRE XVI

LES PESTICIDES

OU PRODUITS ANTIPARASITAIRES

Ce sont des produits chimiques utilisés comme moyen de lutte antiparasitaire.

De tout temps, l'homme a cherché à lutter contre les parasites. Ainsi Homère, mille ans av. J.-C., signale l'utilisation du soufre; Démocrite, cinq cents ans av. J.-C., celle de l'huile d'olive; Pline, cinquante ans av. J.-C., celle de l'arsenic.

Au XVII^e siècle, on se servait de l'arsenic, du mercure et du tabac; à la fin du XIX^e siècle, on utilisait des pesticides minéraux dans la lutte contre les maladies de la pomme de terre en Irlande ou de la vigne.

L'utilisation de pesticides minéraux ou organiques (naturels ou synthétiques) s'est étendue surtout à partir de 1940 alors que certains produits avaient été synthétisés antérieurement: lindane en 1826 (propriétés connues en 1935), DDT en 1873 (propriétés connues en 1939), organomercurels en 1915, carbamates en 1927.

Depuis la loi d'orientation agricole du 5 janvier 2006 (JO du 6 janvier 2006), l'ancienne notion de produits antiparasitaires à usage agricole fait place aux produits phytopharmaceutiques. Ces produits, contenant des substances actives autorisées au niveau communautaire, doivent faire l'objet d'autorisations pour leur mise sur le marché et pour leur distribution pour expérimentation. Dans l'intérêt de la santé publique ou de l'environnement, l'autorité administrative peut prendre toute mesure d'interdiction, de restriction ou de prescription particulière concernant la mise sur le marché, la délivrance, l'utilisation et la détention des produits phytosanitaires. L'étiquetage des produits, dont la vente est autorisée, doit mentionner les indications prescrites, les conditions d'emploi et les précautions à prendre par les utilisateurs, et préciser « pour professionnel » ou « pour jardinier amateur ».

1. Essai de classification des pesticides selon le mode d'action et les cibles

1.1. Insecticides

Après les insecticides à base d'huile minérale ou de minéraux: composés arsenicaux, dérivés du mercure... sont apparus les insecticides organiques de synthèse.

1.1.1. Insecticides organochlorés

La plupart de ces dérivés de très haute toxicité ne sont en théorie plus employés, du fait de l'interdiction d'utilisation. Ces produits provoquent une hépatomégalie⁽¹⁾ avec induction adaptative des enzymes du réticulum lisse hépatique et sont transformés en époxydes très réactifs vis-à-vis des molécules protéiques et des acides nucléiques. Ces époxydes sont généralement stables et stockés dans les lipides. Les époxydes du DDT et du lindane sont, eux, instables. Le DDT désorganise les potentiels des membranes en altérant le transport des ions sodium et potassium, bloque les nerfs moteurs et sensitifs, le cortex moteur et la formation d'ATP musculaire.

L'utilisation du DDT et de la plupart des organochlorés a conduit à des désastres écologiques au niveau terrestre et marin. Par ailleurs, apparaissait la sélection de lignées résistantes de ravageurs. Ceci a conduit, à partir de 1969, à des interdictions successives de ces insecticides.

Cependant, des analyses récentes montrent l'utilisation de ces pesticides, particulièrement toxiques, dans certains pays (pays en voie de développement par exemple).

(1) hépatomégalie: augmentation du volume du foie

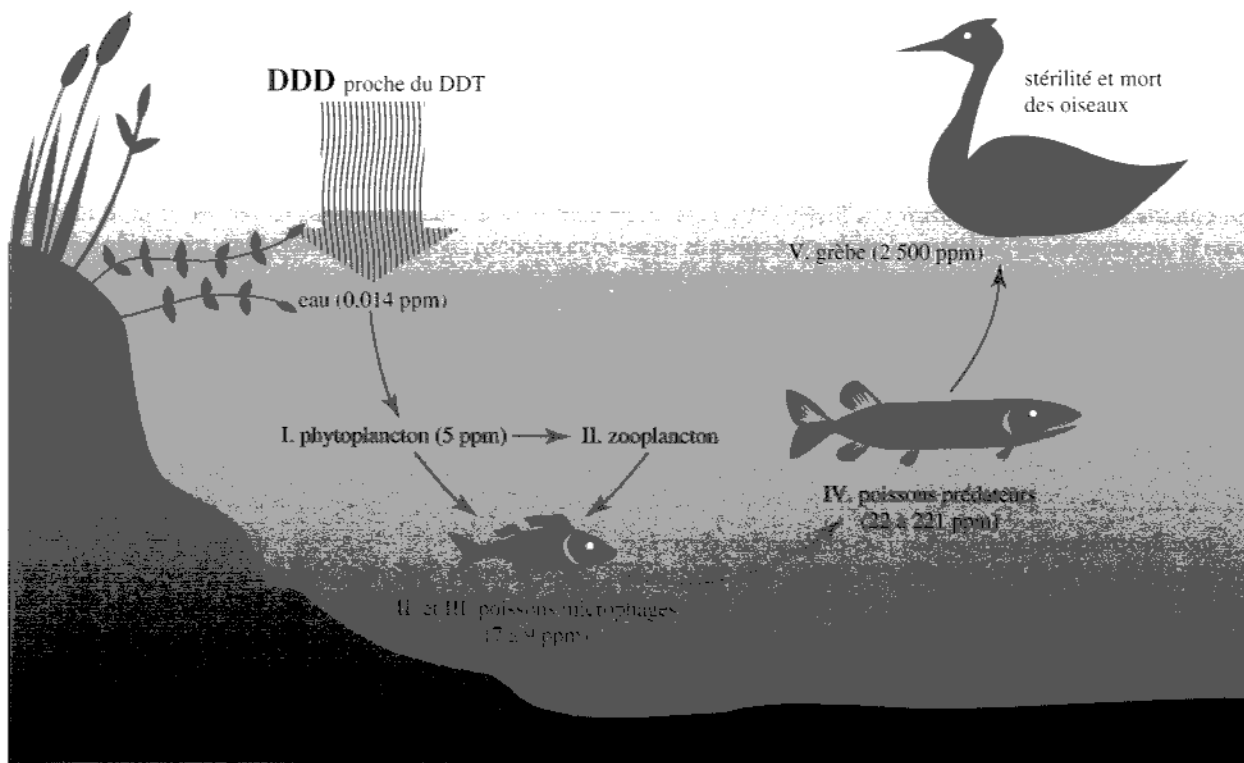
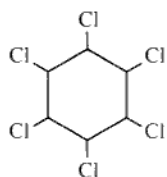


Fig. 1 – Accumulation de pesticides organohalogénés dans un système aquatique.

Des directives de la CEE portent interdiction d'emploi de pesticides à base de mercure et des organochlorés et établissent des mesures de contrôle contre le lindane, dernier survivant de ces pesticides.

Le lindane a pour formule :



Isomère (γ) de l'hexachlorocyclohexane, HCH, ou hexachlorobenzène, il donne des symptômes d'intoxication proches de celle au DDT.

C'est un insecticide très puissant, parasiticide, utilisé en France en médecine humaine et vétérinaire (traitement des poux et des gales) et dont l'usage en agriculture, par pulvérisation ou dispersion par hélicoptère, a été interdit en France en 1998. Le lindane est de coût modéré et beaucoup moins persistant que les autres isomères du HCH. Bien que de formule parfaitement symétrique, il peut subir dans l'organisme quatre types de transformation conduisant généralement à des composés hydrosolubles éliminés dans les urines. Cependant, l'un des composés forme des composés très réactifs induisant une intoxication. La DL 50 du lindane pour le rat est de 88 mg/kg.

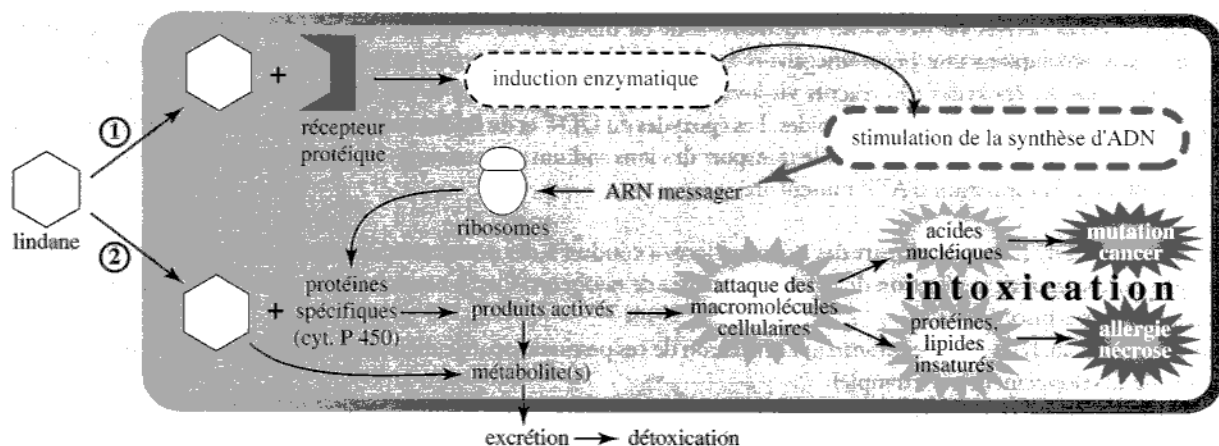


Fig. 2 – L'action cancérogène du lindane

L'action cancérogène du lindane peut s'expliquer par un mécanisme faisant intervenir deux voies complémentaires :

- ① lié à un récepteur protéique, le lindane est véhiculé jusqu'à l'ADN du noyau. La synthèse de protéines spécifiques (cytochrome P 450), est alors favorisée par le biais d'ARN messenger;
- ② le cytochrome P 450 formé, induit sur le réticulum endoplasmique lisse la synthèse de produits activés attaquant les macromolécules cellulaires mais, aussi, de métabolites pouvant être excrétés par l'organisme (c'est le phénomène de détoxification possible).

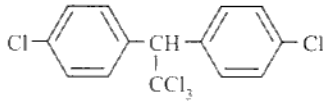
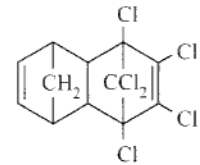
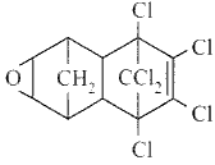
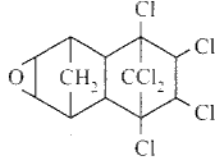
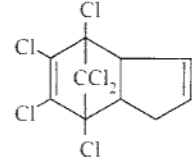
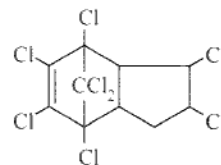
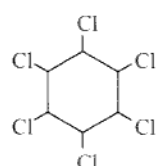
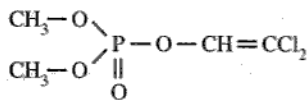
Principaux organochlorés			LMR dans les céréales (mg/kg) Arrêté du 16 juin 1994	Observations
Dichlorodiphényldichloroéthane	DDT		0,05	le p.p'. DDT est le principal composé
Hexachloro-hexahydro-diendométhylène-naphtalène	aldrine		0,01	isomérisie : isodrine
	endrine		0,01	
Hexachloro-époxy-octahydro-diendométhylène-naphtalène	dieldrine		0,01	l'époxyde est un produit important du métabolisme
	heptachlore		0,01	
Octachloro-tétrahydro-méthano-indène	chlordanes		0,02	mélange de chlordanes
Hexachlorocyclohexane ou hexachlorocyclohexène	lindane (γHCH)		0,1	mélange des isomères de l'hexachlorobenzène dont le lindane est le dérivé

Tableau 1 – Principaux organochlorés

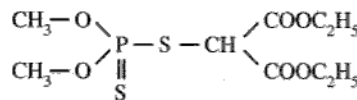
1.1.2. Insecticides organophosphorés

Plus rapidement dégradables, ils ont remplacé les insecticides organochlorés.

Citons parmi les produits particulièrement utilisés : le dichlorvos (dans les plaquettes insecticides), le malathion, le parathion.



Dichlorvos



Malathion

Ce sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, chez les insectes et les vertébrés, par formation d'une enzyme phosphorylée à durée de vie plus longue que l'enzyme acétylée. De plus, les organophosphorés ont des propriétés alcoylantes très actives sur de nombreux réactifs biologiques tels que les groupes alcools, amines, thiols, carboxylates, phosphates, etc., les rendant inactifs. Les actions d'alcoylation sur le groupe NH_2 des chaînes peptidiques ou des groupes phosphorylés des acides nucléiques sont particulièrement marquées.

Les insecticides organophosphorés sont rapidement dégradés par le foie en dérivés oxydes, quelquefois toxiques, mais moins lipophiles et très instables; les liaisons phosphoesters sont détruites. La majeure partie des produits métabolisés sont solubles dans l'eau et excrétés par voie urinaire. L'excrétion par voie fécale est faible.

Si les pesticides organophosphorés sont judicieusement utilisés, la quantité de résidus reste dans les limites acceptables définies par la réglementation. Un bon nombre d'entre eux sont interdits ou doivent être utilisés en quantité très limitée pour l'administration directe ou pour l'alimentation donnée aux animaux consommés par l'homme.

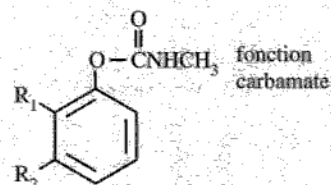
1.1.3. Les carbamates

Leurs propriétés insecticides, fongicides et herbicides sont liées à la fonction carbamate.

Le Baygon®, le carbaryl, le carbofuran sont des carbamates.

L'acétylcholinestérase des insectes est carbonylée, elle peut être réversiblement inhibée; la récupération est plus rapide qu'avec les organophosphorés.

Les microsomes hépatiques sécrètent les enzymes de détoxification des carbamates.



1.1.4. Les insecticides d'origine végétale

- La nicotine

Elle agit par effet acétylcholinomimétique sur les ganglions du système nerveux végétatif et la plaque motrice.

- Les roténoïdes

Ils inhibent l'oxydation du NAD.

1.1.5. Substances à effets spécifiques

L'utilisation intensive des organochlorés, organophosphorés carbamates et autres pesticides chimiques fait apparaître :

- des déséquilibres des écosystèmes par concentration progressive dans les chaînes alimentaires;
- des résidus dans le sol, l'eau de ruissellement et les récoltes;
- des souches résistantes nécessitant des traitements plus nombreux, plus coûteux et plus toxiques.

On a donc cherché à :

- utiliser les mécanismes naturels de défense des plantes;
- perturber le développement des insectes en agissant sur leurs mécanismes hormonaux;
- éviter le regroupement des insectes ou bloquer leur sexualité en empêchant la rencontre des deux sexes.

- Recherche de substances à effets spécifiques

Les recherches s'orientent donc vers :

- les insecticides naturels (alcaloïdes extraits de plantes, terpènes, toxines de micro-organismes...);
- les substances inappétentes (par exemple diterpènes obtenus à partir de plantes);
- des modificateurs de croissance intervenant sur le nombre des mues;
- les phéromones⁽¹⁾ d'agrégation des espèces;
- les phéromones sexuelles attractives.

Les recherches de l'industrie agrochimique portent sur des produits naturels herbicides ou fongicides, des toxines libérées par les champignons (mycoherbicides, antibiotiques, fongicides)...

- Insecticides naturels ou biodégradables

Les pyréthrines naturelles (extraites du chrysanthème) et pyréthrinoïdes de synthèse en sont des exemples. Les pyréthrines sont des esters combinés de deux acides cyclopropaniques, l'acide chrysanthémique et l'acide pyréthrique, avec trois alcools, le pyréthrolone, le cinérolone et le jasmolone. Ces produits modifient la conduction des fibres nerveuses en perturbant les ionophores, canaux d'échange des ions Na^+ et K^+ . Les produits obtenus sont très actifs, non volatils, stables mais facilement dégradés par les micro-organismes du sol et des mammifères; ils ne donnent pas de résidus durables.

Les insecticides peuvent être efficaces par contact, par ingestion, par inhalation (les fumigants) ou par la sève du végétal (on les qualifie alors de systémiques).

(1) Phéromones: substances émises par un animal et agissant sur le comportement des animaux de la même espèce

1.2. Les fongicides

Ce sont des composés toxiques vis-à-vis des champignons inférieurs.

1.2.1. Fongicides actifs par contact

- À base de métaux: Cu, Zn, Hg, As sous forme de sels ou combinés

Les ions métalliques se fixent sur les groupements -SH et bloquent les oxydoréductions et ainsi la partie active d'enzymes.

- À base de soufre

Ils forment des ponts disulfures intra ou inter-moléculaires ou des radicaux libres.

Les carbamates soufrés bloquent les groupements actifs des enzymes.

- À noyau benzénique

Les polychlorés bloquent les groupements -SH.

Les phénols et polyphénols dénaturent les enzymes et bloquent la respiration cellulaire.

Les quinones sont des inhibiteurs de la division cellulaire.

1.2.2. Les fongicides systémiques, solubles dans l'eau et lipophiles

Ce sont :

- les carbamates (Bénomyl, Carbendazime, Thiophanate);
- les pyrimidines (Éthyrimol);
- les thiadiazoles (Thiabendazole).

Tous portent un groupement proche de la carbendazime analogue aux bases puriques, ce qui crée une copie non conforme de l'ADN, donc une anomalie de la transmission génétique. Les fongicides systémiques empêchent les divisions cellulaires.

1.3. Les fumigants: insecticides et fongicides

Les fumigants sont des gaz qui diffusent dans la masse alimentaire en fonction de leur densité: si la densité est faible, la pénétration du gaz est grande. Lorsque le traitement a cessé, les fumigants utilisés doivent s'échapper du produit. Cette capacité est fonction de leur pouvoir de désorption, résultante des propriétés d'attraction et d'adsorption entre le fumigant et l'aliment ainsi que de la lipophilie du fumigant: plus il est liposoluble, plus la désorption est difficile. Enfin, certains fumigants réagissent avec certains substrats contenus dans les aliments. Si la preuve de la formation de dérivés toxiques n'a pas encore été faite, l'on sait que certains nutriments, en particulier les vitamines, peuvent être atteints.

Les principaux fumigants utilisés en agriculture font l'objet d'arrêtés déterminant leurs conditions d'emploi, les mesures de sécurité à prendre pour les professionnels et les doses d'emploi maximales.

1.3.1. L'oxyde d'éthylène

Très inflammable, ce produit dangereux est maintenant interdit d'utilisation.

Il est fortement parasiticide et microbicide.

1.3.2. L'acide cyanhydrique

Il est principalement insecticide. Son coût est peu élevé mais sa toxicité très grande: il peut réaliser dans l'aliment des liaisons covalentes assez solides avec certains métaux. De ce fait, son emploi, très limité, est réservé à des traitements particuliers: locaux et matériels de transports servant au stockage, à la transformation et au conditionnement de végétaux ou de produits animaux, locaux d'élevage, mais dans tous les cas vidés de leurs contenus.

1.3.3. Le bromure de méthyle

Peu coûteux, il est insecticide, fongicide et microbicide. Il est fortement liposoluble; sa désorption, qui est de deux à trois jours pour le blé, est plus longue dans les graines oléagineuses par exemple.

Le brome s'ajoute à celui des aliments. La DJA du brome inorganique est de 1 mg/kg. Certains aliments tels arachides, noix... peuvent présenter des teneurs en brome résiduel supérieures aux normes.

La réglementation précise les végétaux et produits végétaux dont le traitement au bromure de méthyle est autorisé et les teneurs maximales exprimées en ions Br en mg/kg. Il s'agit en particulier:

- des salades, tomates, pommes de terre nouvelles et autres légumes frais;
- des légumes secs et champignons séchés;
- des fruits frais, fruits secs, graines oléagineuses et fruits amylacés;
- des céréales;
- du cacao, du thé, des plantes aromatiques et des plantes à infusion ainsi que des épices.

1.3.4. Le phosphore d'hydrogène (ou phosphine)

Il a un grand pouvoir de pénétration et de diffusion. Il est insecticide et fongicide.

Les teneurs maximales en résidus sont fixées à 0,1 mg/kg pour les céréales brutes (y compris le maïs et le riz) et à 0,01 mg/kg pour tous les autres produits autorisés : légumes et fruits frais ou secs, café, thé, épices, graines oléagineuses, produits semi-finis de céréales, de féculents, poudres de légumes, fruits, cacao et plantes à infusion.

Les analyses montrent le plus généralement des teneurs résiduelles à la limite de la sensibilité des méthodes de détermination. Le phosphore d'hydrogène, non lipophile, ne crée de modification ni organoleptique ni nutritionnelle.

1.3.5. La deltaméthrine

Elle est autorisée pour le traitement du café vert en grains et des graines séchées de légumineuses stockées, à l'exclusion des légumineuses oléagineuses. La teneur résiduelle doit être limitée à 1 mg/kg pour les légumineuses et 2 mg/kg pour le café vert.

1.4. Les herbicides

Ils représentent plus de 70 % de la production des pesticides.

1.4.1. Mécanismes d'action des herbicides

Leurs mécanismes d'action chez les végétaux sont divers. Ils peuvent :

- bloquer la respiration cellulaire : c'est le cas des phénols et des dérivés nitrés des crésols ;
- bloquer la photosynthèse au niveau de la formation des plastes (aminotriazole), le transport d'électrons (triazine, uracile, urées substituées), par la formation de radicaux libres très oxydants (Diquat[®], Paraquat[®]) ;
- perturber la synthèse des acides nucléiques. Les phytohormones, carbamates et les amides perturbent le code génétique ;
- inhiber les enzymes de protéosynthèse (glyphosate organophosphoré) ;
- modifier ou bloquer la division cellulaire (2-4-D, carbamates) ;
- détruire enfin la matière organique (acides forts, huiles du pétrole).

1.4.2. Les deux grands groupes d'herbicides

Les désherbants de contact, tels les chlorates, détruisent les tissus sur lesquels ils sont appliqués.

Les désherbants systémiques, absorbés par les feuilles et les racines, migrent dans tous les tissus de la plante.

• Les acides di et trichlorophénoxyacétiques (2-4-D et 2-4-5T)

Ce sont des hormones végétales de synthèse (auxines), défoliants utilisés au Vietnam.

Ces composés trichlorés, comme tous les pesticides aromatiques porteurs de trois chlores, sont peu biodégradables. Toxiques en grande quantité, ces produits ont aussi des effets tératogènes sur rats et souris et sont néfastes pour les abeilles.

Ces constituants sont synthétisés à partir du trichlorophénol dont la toxicité aiguë se manifeste à dose assez faible (DL 50 : 300 mg/kg de poids d'animal). La dioxine, son impureté toujours présente, est un produit hautement toxique (DL 50 : 0,022 mg/kg pour le rat).

• Les ammoniums quaternaires

Ils sont aussi employés comme bactéricides en contact des denrées alimentaires et nécessitent un rinçage poussé compte tenu de leur toxicité. Deux d'entre eux sont utilisés en agriculture : le Diquat[®] et le Paraquat[®], désherbants systémiques, fréquemment employés dans les vergers, les vignes, les cultures de pommes de terre. Ils entraînent la formation de radicaux libres.

• Les dérivés de l'urée substituée

Désherbants systémiques, ils sont utilisés pour tous les types de végétaux. Peu toxiques, ils ne font pas l'objet de réglementation concernant leurs résidus dans les végétaux, sauf en ce qui concerne le néburion.

• Les diazines et triazines

Ces désherbants systémiques sont considérés comme peu dangereux ; en particulier l'amétryne, l'atrazine, la simazine, triazines utilisées dans les cultures de maïs, sorgho, arbustes et arbres fruitiers, cultures d'ananas, de canne à sucre et bananiers ainsi que pour désherber les lieux publics, bordures de voies ferrées, etc.

Ces dérivés utilisés en grande quantité ont créé des résistances chez les plantes. Par ailleurs, leurs molécules très stables, non fixées dans le sol, contaminent les nappes phréatiques, ce qui les a fait interdire en 2003.

• Les dérivés du benzène (colorants nitrés)

Insecticides, fongicides, mais surtout désherbants, ils sont inscrits pour la plupart dans la liste I des substances vénéneuses. Ce sont des méthémoglobinisants, toxiques pour la peau et les muqueuses, utilisés généralement dans la culture des céréales.

• Certains carbamates dérivés de l'acide carbamique ou de l'acide thiolcarbamique

- **Le glyphosate: acide (phosphonométhylamino) – 2 acétique et ses sels**

L'un d'entre eux, très connu des jardiniers amateurs, le Round Up[®], utilisé comme herbicide total dans le monde entier, est très peu toxique et rapidement dégradé par les bactéries du sol. Néanmoins le comité phytosanitaire permanent de l'Union européenne demande, au sujet de ce produit, aux États membres « d'accorder une attention particulière à la protection des eaux souterraines dans les zones vulnérables ».

1.5. Pesticides d'emploi particulier

On utilise des pesticides dans la lutte contre les rongeurs (les rodenticides), les limaces et les escargots (les hélicides) et les vers parasites (les nématocides).

Il s'agit de biocides, produits destinés à « détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre, de toute manière, par une action chimique ou biologique ».

2. Dangers des pesticides

Insidieusement, les pesticides envahissent les milieux, l'eau, les aliments et présentent des dangers.

2.1. Pour l'environnement

Le danger est fonction de la rémanence des produits; celle des organochlorés est la plus longue (DDT 1/2 vie: dans l'eau dix ans, dans le sol quarante ans; dieldrine: vingt ans).

Certains concentrateurs biologiques les accumulent: les lombrics concentrent quatorze fois le DDT du sol, les mollusques très fortement le DDT de l'eau. Les pesticides détruisent les prédateurs des insectes.

2.2. Pour l'homme

Les pesticides sont impliqués dans de nombreuses intoxications aiguës ou subaiguës accidentelles dont les symptômes sont connus. Les professionnels: fabricants, utilisateurs, subissent des intoxications chroniques. Les règles d'utilisation doivent donc être rigoureusement respectées.

La toxicité à long terme des pesticides est fonction de facteurs intrinsèques: âge, état du sujet, et extrinsèques: niveau nutritionnel, pollution de l'environnement. Les effets à long terme font l'objet d'études portant sur la mutagénicité, la tératogénicité et la cancérogénicité.

Mais globalement, à court terme, les insecticides ont pu limiter certaines maladies transmises par les insectes. De faible coût, ils permettent d'augmenter les récoltes effectives mondiales détruites par les insectes, les maladies des plantes et limitées par la croissance des mauvaises herbes. Cependant, la tendance à la culture uniformisée rend plus fragiles les plantations, poussant les agriculteurs à utiliser toujours plus de produits phytosanitaires, d'où l'importance du développement de la lutte biologique pour limiter la lutte chimique.

3. La réglementation

Elle précise, dans certains cas, les traitements antiparasitaires ou chimiques autorisés pour les végétaux (par exemple les céréales brutes stockées), les teneurs maximales en « résidus de pesticides », c'est-à-dire les reliquats de pesticides ou LMR ainsi que, le cas échéant, leurs produits de métabolisation, de dégradation ou de réaction.

Ces tolérances maximales, adoptées sous la forme d'une liste communautaire non exhaustive, comprennent:

- des limites pour le même contaminant dans différentes denrées alimentaires;
- des limites de détection analytique et une référence aux méthodes d'échantillonnage et d'analyse à appliquer.

À cette liste, dans la mesure où les dispositions communautaires n'ont pas été adoptées, peuvent s'ajouter des dispositions nationales, à condition qu'elles soient fixées dans le respect des dispositions du Traité. Ainsi, en France, les teneurs maximales pour près de 150 résidus de pesticides sont précisées pour les céréales et près de 250 pour les fruits et les légumes. Les arrêtés successifs ont mis en évidence l'augmentation du nombre de pesticides.

4. Effets positifs des traitements technologiques sur les pesticides

Le lavage élimine assez bien les fongicides. L'épluchage est efficace contre les pesticides de surface, mais peu contre les insecticides systémiques.

Le chauffage en milieu humide: cuisson ménagère ou stérilisation, détruit 100 % des organophosphorés, le blanchiment 80 %.

Les pesticides liposolubles subissent une perte importante par entraînement à la vapeur.

Famille du pesticide	Dénomination usuelle	Teneurs maximales LMR (mg/kg)	Catégories de fruits et de légumes visées	Observations
Organo chlorés	Aldrine et Dieldrine interdits en 1973 en France.	0,01	Fruits et légumes.	Rémanence très longue.
	Chlordane (isomères cis et trans, y compris l'oxychlordane) interdit en 1972 en France.	0,01	Fruits et légumes.	Rémanence très longue de ce composé.
	DDT (somme des isomères op, pp', pp' DDE, pp' TDE) interdit en 1969 en France.	0,05 (0,1 était fixé en 1990)	Fruits et légumes.	Rémanence très longue de ce composé.
	Gamma HCH (γ hexachloro cyclohexane), lindane insecticides interdits en 1998 en France.	0,01	Légumes et fruits.	2 à 0.1 suivant les végétaux (arrêté du 10 octobre 1998).
	Heptachlore (y compris l'analogue oxydé) interdit en 1973 en France.	0,01	Fruits et légumes.	
	Hexachlorobenzène (fongicide).	0,01	Légumes et fruits.	Non utilisé, légumes contaminés par les résidus.
	2, 4, 5-T (herbicide).	0,05	Fruits et légumes.	
	Imazalil (fongicide).	5 0,1 2 0,2 0,02	Agrumes (fruit entier), fruits à pépins. Pulpe agrumes, chicorée. Banane (fruit entier) melon. Pulpe banane (en liaison avec l'arrêté du 14 octobre 1991), cucurbitacées à peau comestible. Autres fruits et légumes.	
Organophosphorés	Azinphos éthyl.	0,05	Fruits et légumes.	Interdits 15 jours avant la récolte.
	Azinphos méthyl.	1 0,5	Raisin, agrumes. Autres fruits et légumes.	
	Bromophos éthyl. Bromophos. Hepténophos.	0,05 1 0,1.	Fruits et légumes. Fruits et légumes.	Interdits 15 jours avant la récolte.
	Parathion (y compris l'analogue oxydé).	0,05	Fruits et légumes.	Interdits 15 jours avant la récolte.
	Parathion méthyle (y compris l'analogue oxydé).	0,02		
Dérivés du brome	Bromopropylate.	2 2 1 0,05	Agrumes, raisin. Fruits à pépins. Légumes, tomates. Autres fruits, cucurbitacées.	Utilisation interdite 15 jours avant la récolte ; non dangereux pour l'environnement.
	Bromure de méthyle (fumigant).	0,1 0,05	Abricot, pêche, noix, prune. Légumineuses séchées. Autres fruits et légumes.	
Carbamates (fongicides)	Dithiocarbamates (exprimés en Disulfure de carbone).	5 3 2 1 0,2 0,1 0,5	Fines herbes, laitue et similaires, agrumes, groseilles. Fruits à pépins. Pêche, abricot, fraise, raisin, cucurbitacées à peau non comestible, solanacées. Choux, cerise, prune, légumes-bulbes, légumes-tiges. Endive, légumes-racines. Noix. Autres fruits et légumes.	
	Pyrimicarbe (y compris le Desméthyl et l'analogue méthylaminé).	1 0,5 0,3 0,2 0,1 0,02	Framboises mûres. Fruits à pépins, à noyaux, laitue, choux. Tomates, poivrons, choux fleurs. Cerises, fraises. Épinards. Carottes.	Utilisation 7 jours avant la récolte sur légumes. 0.5 généralisé en 1998
Origine végétale	Pyrèthres (insecticides)	1	Fruits et légumes.	Aucune interdiction d'emploi avant la récolte.
Minéral	Soufre	50	Prunes, cerises.	

Tableau 2 – Teneurs maximales admissibles en résidus de pesticides dans les fruits et légumes (extrait de l'arrêté du 10.09.1998)

Pour les pesticides, dont l'emploi n'est plus autorisé, la teneur résiduelle doit être inférieure ou égale à la limite de sensibilité de la méthode d'analyse officielle.

CHAPITRE XVII

LES MYCOTOXINES

Bien utiles pour fabriquer les fromages, les antibiotiques, les enzymes..., les moisissures, champignons microscopiques, peuvent sécréter des substances toxiques : les mycotoxines.

1. La contamination par les moisissures

Plus de cent mille moisissures différentes sont susceptibles de souiller les produits agricoles et alimentaires. Ce sont des espèces saprophytes tirant leurs apports nutritionnels des matières organiques.

La contamination se fait par les spores douées d'une grande aptitude à la survie et souvent adaptées au transport par l'air ; certaines ont de grandes propriétés d'adhésion et leur transport est favorisé par une ambiance chaude et humide.

1.1. Facteurs favorisant la contamination

Un certain nombre de facteurs favorisent la colonisation des aliments par les moisissures :

- les **blessures** des parois ou des enveloppes externes des aliments ;
- la **température** : 20 °C à 30 °C est une zone optimale de croissance, mais les moisissures peuvent croître dans une gamme très large de températures ;
- la **composition de l'atmosphère gazeuse**. Les moisissures sont généralement aérobies et l'augmentation de l'atmosphère en dioxyde de carbone limite leur croissance ;
- la **nature du substrat**. En général, le substrat optimal est glucidique. L'aflatoxine est sécrétée sur l'amidon ; la zéaralénone du maïs sur la cellulose.

Les autres constituants du substrat ainsi que le pH interviennent aussi ;

- la **teneur en eau**. C'est le facteur essentiel. Les moisissures sont moins exigeantes en eau que les levures ou les bactéries, cependant un minimum d'eau du milieu leur est nécessaire. Ceci permet la prévention par le maintien à une hygrométrie faible des graines de céréales ou de légumineuses (arachide) en silos.

1.2. Formation des mycotoxines dans les végétaux

On connaît actuellement près de 300 mycotoxines produites par environ 200 espèces de moisissures.

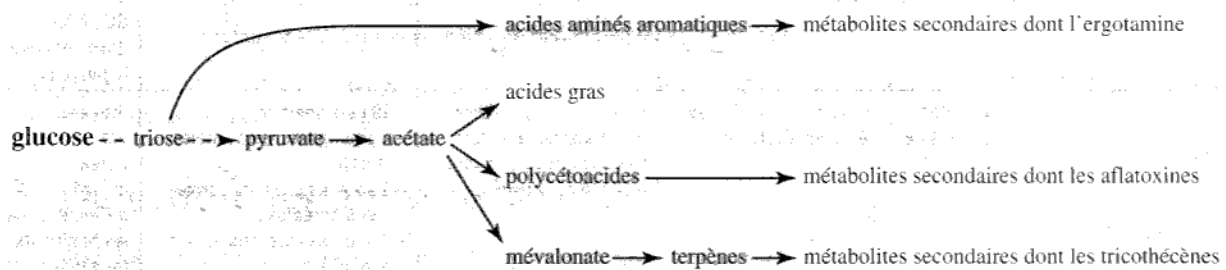
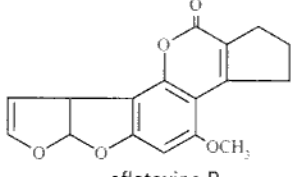
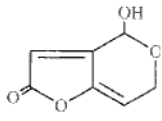
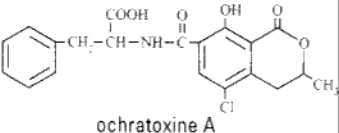
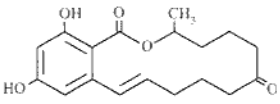


Fig. 1 – Biosynthèse des mycotoxines

Ces métabolites secondaires synthétisés pendant la phase stationnaire après les stades de multiplication et de croissance semblent être des voies de secours utilisées, rarement d'ailleurs, lorsqu'il y a accumulation excessive de métabolites tels triose, acétate...

1.3. Les principales mycotoxines et leurs effets chez l'êtr humain

Mycotoxine	Moissure produisant la toxine	Substrat sur lequel la toxine se forme	Effets pathologiques	Concentration maximale admissible LMR µg/kg	Prévention ou élimination par :
Ergotamine	<i>Claviceps purpurea</i> = ergot du seigle <i>Claviceps</i> divers	– Seigle. – Autres céréales.	– Effets neurotoxiques : vasoconstricteurs (contraction des muscles lisses). – Gangrène des extrémités.		Criblage des céréales (le champignon mesure 1 à 1,5 cm de long).
Aflatoxines* B ₁ et B ₂ G ₁ et G ₂ M ₁ (métabolite de B ₁)	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	– Arachide conservée en tas (Afrique), donc tourteaux d'arachide, donc lait des animaux. Plus rarement : – céréales ; – graines oléagineuses européennes ; – légumes secs ; – fruits oléagineux tropicaux ; – épices (qui contiennent tous les aliments).	La plus toxique est B ₁ , douée de : – cancérogénicité du foie, rein, estomac, côlon ; – mutagénicité ; – tératogénicité ; – hépatotoxicité : infiltration lipidique, signes de cirrhose, hépatique ; – neurotoxicité ; Effets plus marqués si : – subcarence protéique ; – carence en vitamine A ; – dénutrition ; – infections...	Aflatoxine B ₁ : – 0,1 pour préparations à base de céréales et aliments pour enfants de moins de 3 ans ; – 2 pour toutes les céréales et les huiles végétales ; – 2 pour les farines blanches ; – 2 pour les arachides, pistaches, amandes, graines oléagineuses pour consommation directe ; – 5 pour le maïs avant traitement ou comme ingrédient – 8 pour les arachides avant traitement ou comme ingrédient – 10 pour tous autres aliments non précisés.	Élimination par le raffinage des huiles, prévention par le stockage des graines en silo. L'ionisation de ces substrats a un rôle essentiel préventif.
 aflatoxine B ₁ la plus toxique					
venant de l'anglais, B fluorescence bleue, G fluorescence verte, M Milk					
Lutéoskyrine	<i>Penicillium islandicum</i> , <i>citrinum</i> , <i>bruneum</i>	– Riz jauni. – Autres céréales.	Lésions et dégénérescence graisseuse du foie.		
Patuline	Sécrétée par de nombreux <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> dont <i>Penicillium patulum</i>	– Pommes, jus de pommes et dérivés. – Cidre. (Compote et confiture sont moins contaminées du fait du tri des végétaux et de la cuisson). – Autres fruits : poires. Céréales (rares).	Bloque les groupements thiols, inhibe la synthèse des macromolécules (ARN et ADN). Pouvoir tératogène, effets génotoxiques. Cancérogénicité discutée. Effets immunodépresseurs.	– 50 pour cidre et jus de pommes. La patuline est instable dans les jus d'agrumes. – 25 pour les produits à base de morceaux de pommes (compote...)	– Apport des pommes le plus rapidement possible à la cidrerie. Contrôler des fruits. La pasteurisation, la cuisson détruisent la patuline. La patuline diminue au cours de la fermentation alcoolique. SO ₂ à forte dose, inactive la patuline.
					
Ochratoxines A et B*	Certaines souches de <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>	Maïs, blé, orge. Toutes céréales. Certaines légumineuses. Fruits secs. Café. Cacao.	Hépatotoxicité : infiltration graisseuse du foie. Lésion du rein, Tératogénicité. Neurotoxicité.	– 10 café soluble ; – 5 pour toutes les céréales, le café ; – 3 pour les produits dérivés des céréales ; – 2 pour les vins, raisins (jus et moût) ; – 0,5 pour les préparations à base de céréales pour enfants en bas âge.	Stockage contrôlé des céréales en silo et traitements par les fumigants fongicides : bromure de méthyle, phosphore d'hydrogène.
 ochratoxine A					

Mycotoxine	Moissure produisant la toxine	Substrat sur lequel la toxine se forme	Effets pathologiques	Concentration maximale admissible LMR µg/kg	Prévention ou élimination par :
Trichothécènes* (70 variétés)	<i>Fusarium</i> divers	Céréales.	Très cytotoxiques, sécrétés même à 0 °C. Neurotoxiques. Immuno- suppresseurs.	Valeurs non fixées.	
Zéaralénone* 	<i>Fusarium</i> <i>gramineum</i>	Maïs, blé, autres céréales.	Effets endocriniens, œstrogéniques et effets anabolisants.	- 100 pour les céréales brutes ; - 75 pour les farines de céréales ; - 50 pour les produits dérivés de céréales ; - 25 pour les préparations pour nourrissons et les enfants en bas âge.	

* Mycotoxines préoccupant particulièrement l'OMS.

Tableau 1 – Les principales mycotoxines et leurs effets chez l'être humain

1.4. Propriétés physico-chimiques des mycotoxines

Ce sont généralement des substances à prédominance liposoluble que l'on extrait par des mélanges chloroforme – eau. La cuisson, le froid et les technologies industrielles ne détruisent pas les mycotoxines. Seule la filtration des huiles les élimine.

1.5. Contamination des aliments pour animaux

Après absorption, les mycotoxines sont métabolisées. La teneur en mycotoxines et en leurs métabolites est fonction de la concentration dans la ration, de l'espèce animale, du délai entre l'arrêt de l'aliment contaminé et l'abattage de l'animal qui, généralement, ne présente pas de symptômes d'intoxication. Le passage transplacentaire est possible. Tous les aliments animaux concentrent les mycotoxines : viandes, abats, œufs, lait.

Les teneurs maximales en mycotoxines dans les aliments pour animaux sont réglementées en France : 0,01 mg/kg d'aliment complet (humidité 12 %) pour les ruminants ; 0,02 mg/kg pour les porcins et les volailles. Dans les pays développés, les bonnes pratiques agricoles tendent à réduire les taux de mycotoxines dans l'alimentation animale de base.

2. Particularités de la réglementation concernant les mycotoxines

- Dans les produits laitiers, on recherche l'aflatoxine M₁, métabolite de l'aflatoxine B₁. En effet, par le biais de l'ingestion de tourteaux d'arachide contaminés, la vache donne un lait contaminé. L'aflatoxine M₁ est toxique, mutagène, cancérigène.

Laits liquides	0,05
Lait liquide destiné aux enfants de moins de trois ans	0,025
Préparations destinées aux nourrissons et préparations de suite	0,025

Tableau 2 – Limites maximales de résidus en µg/kg dans les produits prêts à être utilisés

Les préparations enzymatiques à usage alimentaire ne doivent pas renfermer de quantités détectables de mycotoxines, ni d'ailleurs d'autres métabolites toxiques.

3. Détection des mycotoxines

Sont utilisées les techniques classiques : chromatographies liquide ou gazeuse, spectrométrie de masse et immunodétection à l'aide de kits de dosage à base d'anticorps.

CHAPITRE XVIII

LES ADJUVANTS DE L'ALIMENTATION ANIMALE ET LES MÉDICAMENTS VÉTÉRINAIRES

1. Les additifs dans l'alimentation animale

Les aliments pour animaux se présentent sous forme :

- d'aliments secs (farines, agglomérés, extrudés, flocons) ayant une teneur en eau de 12 % à 14 % ;
- d'aliments semi-humides à teneur en eau de 30 % à 40 % ;
- d'aliments humides à teneur en eau de 70 % à 80 %.

Les additifs peuvent être technologiques pour élaborer, structurer ou conserver l'aliment. Certains, en modifiant la couleur, l'odeur, la texture sont destinés à favoriser la consommation de l'aliment par l'animal.

Enfin, sont ajoutés minéraux, vitamines, acides aminés, antibiotiques pour maintenir un bon état de santé du cheptel, fragilisé par l'élevage intensif ou en batterie.

On emploie aussi, pour les ruminants, des composés azotés non protéiques tels que biuret, urée, phosphate d'urée... Ces substances favorisent l'entretien et la croissance de la flore du rumen, responsable de la synthèse des protéines qui seront ensuite incorporées par l'herbivore.

1.1. La réglementation

Des décrets, fixés suite aux directives européennes, précisent :

- la liste de ces additifs ou des prémélanges d'additifs ;
- les conditions d'incorporation à l'aliment ;
- les conditions de commercialisation et les indications devant être portées sur l'étiquetage.

Des dispositions particulières concernent :

- les antibiotiques – additifs (régulateurs de flore) ;
- les coccidiostatiques ;
- les autres substances médicamenteuses ;
- les antioxygènes ;
- les vitamines A et D ;
- le cuivre et le sélénium, entre autres minéraux.

1.1.1. Les antibiotiques – additifs ou “ régulateurs de flore ”

Utilisés depuis plus de trente ans, en modifiant probablement la flore intestinale, ils stimulent la croissance des animaux et réduisent leur taux de mortalité et de morbidité. Ils sont utilisés à dose subthérapeutique.

L'utilisation de ces antibiotiques est fonction de l'espèce animale, de l'âge de l'animal et des conditions d'élevage.

À la suite de l'arrêté du 28 février 2000, relatif à l'agrément et l'enregistrement des établissements fabriquant ou utilisant des additifs pour l'alimentation animale, les additifs antibiotiques sont plus strictement contrôlés.

Depuis cette date, seuls peuvent être utilisés :

- l'avilamycine E 717, utilisable pour les porcelets (jusqu'à 4 mois), les porcs (jusqu'à 6 mois), les dindons et les poulets de chair ;
- le flavophospholipol E 712, (ou flavomycine) pour de nombreuses volailles, lapins, porcelets et porcs, veaux et bovins ;
- le monensin-sodium E 714, pour les bovins à l'engraissement, mais il est aussi autorisé comme coccidiostatique E 757 pour les poulets de chair et les dindons (sauf 3 jours avant l'abattage), les poulettes destinées à la ponte ;
- le salinomycine-sodium E 716, antibiotique-additif pour les porcelets (jusqu'à 4 mois) et les porcs (jusqu'à 6 mois), est aussi coccidiostatique E 766 pour les poulets et lapins de chair (sauf 5 jours avant l'abattage).

La teneur en ces composés est réglementée pour les aliments complets.

Certains pays ont interdit les antibiotiques-additifs dans l'alimentation animale. Ils représentent près de 50 % des antibiotiques totaux utilisés pour les animaux et peuvent être responsables de résistances, voire de multirésistances, des bactéries aux antibiotiques-médicaments. Or, la création de molécules antibiotiques est limitée.

En effet, le transfert de gènes existe chez tous les types de bactéries, entre tous les genres bactériens. Les moyens de transfert du matériel génétique d'une bactérie à une autre peuvent être : conjugaison via les plasmides R, transpositions via les transposons¹, transduction via les bactériophages et transformation à la suite de la capture d'ADN libre. L'acquisition de la résistance à un seul antibiotique favorise la multirésistance, surtout dans les conditions de pressions biologiques créées par l'élevage intensif.

Il a été prouvé que la dispersion des bactéries résistantes dans le cheptel gagne tout l'environnement : sol, végétaux, les animaux et aussi l'homme éleveur, le transfert pouvant aussi se faire de l'homme aux animaux. La suppression d'antibiotiques-additifs nécessite d'autres modes d'élevage, plus respectueux du bien-être animal.

1.1.2. Les coccidiostatiques et autres substances médicamenteuses

Les coccidies, sporozoaires ovales de petite taille, affectant plus particulièrement les volailles et les lapins, peuvent créer des maladies, parfois mortelles, en se fixant sur la muqueuse digestive et le foie.

L'histomonose, due à un protozoaire flagellé, atteint les dindons et provoque des inflammations du cæcum et du foie.

Certaines substances médicamenteuses, telle que dimétridazole, sont utilisées en prophylaxie chez les dindons et les pintades, sauf pour la ponte et six jours avant l'abattage.

2. Les médicaments vétérinaires

Leur commercialisation ne peut avoir lieu qu'après une AMM, donc les possibilités de toxicité directe sont exclues. Le protocole applicable aux essais toxicologiques et pharmacologiques des médicaments vétérinaires est fixé par un arrêté. Dans celui-ci, l'étude des résidus, tant au point de vue détermination qu'effets toxiques, fait l'objet d'un long développement. La définition de « résidus » y est donnée : ce sont tous les principes actifs ou leurs métabolites qui subsistent dans la viande et autres denrées animales provenant de l'animal auquel le médicament en cause a été administré. Les éleveurs faisant partie d'un groupement peuvent utiliser une grande variété d'antibiotiques-médicaments, à condition de prendre en compte la durée obligatoire intervenant entre la dernière utilisation du produit et la mise en vente de l'animal. Cette durée est fonction de la cinétique de dégradation de l'antibiotique dans l'organisme et de la préparation galénique dans laquelle il est inclus. Les résidus d'antibiotiques dans les aliments animaux ne peuvent être mis en cause dans les mécanismes d'induction de sensibilisation, compte tenu des faibles quantités qui pourraient être présentes et de leur forme d'introduction dans l'organisme. Les manifestations allergiques imputables aux résidus d'antibiotiques sont d'ailleurs peu fréquentes et peu graves. Peu à peu, les recherches sur les antibiotiques-additifs ou médicaments destinés aux animaux permettent d'obtenir une gamme de produits différente de celle utilisée en médication humaine.

3. Les hormones anabolisantes et les viandes

3.1. Évolution de la réglementation dans la CE

La directive de la CEE du 31 juillet 1981 imposait aux États membres d'interdire les anabolisants de synthèse, les stilbènes (de structure moléculaire proche de l'œstradiol), leurs dérivés, sels et esters dont le DES (diéthylstilbestrol), tous les produits œstrogénomimétiques ainsi que les thyrostatiques et les extraits thyroïdiens dont le MUT (méthylthiouracil).

Les évaluations toxicologiques de ces dérivés laissent de nombreux doutes, et certains, comme le DES, sont à l'origine de résidus à potentialité toxique.

3.1.1. Utilisation des hormones dans la CE

	F	GB	Irl	RFA	B	NL	Lux	I	DK	GR
Zéranol (artificiel)	I	A	A	I	I	I	I	I	I	I
Œstradiol, œstrone (naturels)	A	A	A	(A)	I	I	I	I	I	I
Progestérone	A	A	A	(A)	I	I	I	I	I	I
Testostérone	A	A	A	(A)	I	I	I	I	I	I
Trenbolone (artificiel)	A	A	A	I	I	I	(A)	I	I	I

A = autorisé (A) = sous réserve I = interdit

Tableau 1 – Les hormones dans la Communauté européenne en 1985

3.1.2. Les hormones dites naturelles

Elles sont obtenues le plus souvent par synthèse et identiques à celles sécrétées par les organes sexuels :

- l'œstradiolœstrogène ;
- la progestéroneprogestogène ;
- la testostéroneandrogène.

Progestérone et testostérone potentialisent l'œstradiol.

3.1.3. Les hormones étrangères aux organismes

Elles sont dites xénobiotiques ou hormones artificielles :

- l'acétate de trenbolone à effet androgène ;
- le zéranol, œstrogénétique, mycotoxine d'un champignon microscopique, fait partie des résorcylol-acid-lactones (RAL).

Pour la France, ces hormones disposent en 1984 d'AMM, sous forme de six spécialités vétérinaires. L'acétate de trenbolone est dix fois plus anabolisant que la testostérone et trois à cinq fois plus anabolisant qu'androgène. Il potentialise les effets anabolisants des œstrogènes tels que œstradiol et zéranol. L'augmentation du bilan azoté se fait aux dépens de l'excrétion urinaire.

3.1.4. Intérêt de l'utilisation des hormones

Il tient au fait qu'elles sont des anabolisants. Sur la base d'études antérieures d'innocuité, certains États membres de la CE ont autorisé ces cinq hormones, d'autant que les résidus dans les viandes sont extrêmement faibles, même pour le zéranol. En stimulant la synthèse protéique, les anabolisants favorisent l'augmentation du volume des viandes des animaux traités, et ce, pour une même quantité d'aliments consommés.

Les hormones autorisées, seules ou en mélanges, sont administrées aux veaux mâles et femelles, génisses, taurillons et vaches de réforme.

EXEMPLE : UTILISATION CHEZ LE VEAU

Les hormones sont déposées en implants, introduits en un point de l'oreille qui sera jeté au moment de l'abattage. Elles entraînent :

- une augmentation de gain de poids vif importante ;
- une augmentation de la résistance des veaux élevés en batterie aux agressions pathologiques, par stimulation du système réticulo-endothélial ;
- une baisse de la mortalité de 0,7 à 2,8 % ;
- une meilleure conformation de la carcasse.

Les conséquences pour le consommateur sont moyennement intéressantes.

La viande est plus maigre, mais contient un peu plus d'eau ; la teneur protéique est identique en qualité et en quantité. Les modifications lors de la cuisson sont négligeables si la maturation de la viande a été menée correctement. Les qualités organoleptiques sont légèrement affectées. Il n'y a pas de conséquences toxicologiques à craindre. Cependant, le prix de la viande reste le même. Le coût de stockage des viandes produites en excès par la CE est élevé. Les écologistes et des organisations européennes de consommateurs s'opposent toujours à l'introduction des hormones.

3.1.5. Interdiction des hormones

En 1985, une directive de la CEE interdit les hormones stéroïdiennes sexuelles et leurs dérivés dans tout pays du Marché Commun à partir de 1988.

Mais le grand problème des viandes aux hormones est la difficulté du contrôle. De nouvelles hormones, pouvant donner des résidus toxiques, font leur apparition et les traces d'hormones existent toujours. Il semble que l'interdiction globale des hormones conduise à l'emploi clandestin de composés dangereux, difficiles à mettre en évidence par l'analyse.

3.2. L'hormonothérapie en élevage

Des produits non autorisés sont utilisés pour faciliter la croissance.

3.2.1. Les agonistes β_2 -adrénergiques (β_2 -stimulants, β_2 -sympathicomimétiques)

Voisines des catécholamines, ces substances sont nombreuses, utilisées largement en médecine humaine pour leurs propriétés myorelaxantes au niveau respiratoire ou utérin. Les β_2 -stimulants facilitent le développement des masses maigres et réduisent les dépôts de graisse chez les animaux (d'où leur nom « d'agents de répartition »), en agissant sur les récepteurs β_2 -adrénergiques.

Ce processus est potentialisé par la somatotrophine, hormone de croissance.

Les risques pour la santé de l'ingestion de leurs résidus sont à l'étude. Cependant, certaines maladies asthmatiques traitées à vie par des composés très voisins laissent supposer leur innocuité.

3.2.2. Les neuropeptides de croissance

La BST (*Bovine Somatotropine*) ou somatotrophine ou hormone de croissance (GH), neuropeptide sécrété par l'hypophyse, se trouve à l'état de traces normales dans le lait de vache. Les teneurs sont identiques dans le lait d'animaux traités. Par ailleurs, la BST est détruite par les enzymes protéolytiques digestives et sa séquence polypeptidique est spécifique de chacune des espèces.

Cette hormone augmente les masses musculaires de 15 % à 20 %, améliore l'indice de conversion des aliments de près de 20 % et diminue les réserves graisseuses. Elle augmente la production de lait de 15 % à 20 %, ce qui permet, dans le cadre des quotas de la CE, de produire la même quantité de lait avec moins d'animaux et surtout, en ne l'utilisant qu'à certaines périodes de l'année, d'adapter la production à la consommation.

3.2.3. Plans de surveillance

Des plans de surveillance des facteurs de croissance à base d'hormones prévoient des contrôles effectués par sondage en élevage et à l'abattoir, et des prélèvements réalisés sur des animaux ou des carcasses suspects.

Sur une soixantaine de composés recherchés, les hormones stéroïdiennes, principalement l'œstradiol (chez les veaux et vaches de réforme), la nandrolone (chez les jeunes bovins et les vaches de réforme) et certains β -agonistes sont souvent mis en cause.

BIBLIOGRAPHIE

Livres

- AFNOR. *Recueil des normes françaises*. 7^e édition. Paris : AFNOR, 1999. 510 pages.
- AMGAR, A. *Listeria et sécurité alimentaire*. Laval : ASEPT, 1991.
- ASPEC. *Salles microbiologiquement maîtrisées appliquées aux plats cuisinés et produits équivalents*. Paris : ASPEC, 1992.
- AVRIL, J.-L., DABERNAT, H., DENIS, F., MONTEIL, H. *Bactériologie clinique*. Paris : Ellipses éd. Marketing, 1988. 510 pages.
- ISOARD, P. *Guide de la biocontamination*. Paris : ASPEC, 1988.
- BERNIER, J.-L., ADRIAN, J., VIDON, N. *Les aliments dans le tube digestif*. Paris : Doin, 1988.
- BOURGEOIS, C.-M., LEVEAU, J. *Microbiologie alimentaire – Tome 1 : Aspects microbiologiques de la sécurité et de la qualité alimentaire*. Paris : Tec et doc, 1988.
- CHAVERON, H. *Introduction à la toxicologie nutritionnelle*. Paris : Tec et doc, 1999.
- DERACHE, R. *Toxicité et sécurité des aliments*. Paris : Technique et documentation (Lavoisier), 1989.
- FRENEY, J., RENAUD, F., HANSEN, W., BOLLET, C. *Manuel de bactériologie clinique*. Paris : Éditions scientifiques Elsevier, 2000.
- JOFFIN, C. et J.-N. *Microbiologie alimentaire*. 5^e édition. Bordeaux : CRDP d'Aquitaine, 1999.
- LE MINOR, L., VERON, M. *Bactériologie médicale*. Paris : Flammarion, 1990.
- LEYRAL, G., FIGARELLA, J., TERRET, M. *Microbiologie appliquée*. Malakoff : Lanore, 1994. 239 pages.
- LEYRAL, G., FIGARELLA, J., TERRET, M. *Microbiologie générale*. Malakoff : Lanore, 1992. 207 pages.
- LEYRAL, G., JOFFIN, J.-N. *Microbiologie technique - Tome 1, Dictionnaire des techniques* (4^e édition, 2006) ; *tome 2, Documentation technique* (2^e édition, 1998). Bordeaux : CRDP d'Aquitaine.
- MEYER, A., DEIANA, J., LECLERC, H. *Cours de microbiologie générale*. Paris : Doin, 1994.
- MULTON, J.-L. *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires*. Coll. Sc. Tech. Agro-alim. 2^e édition. Paris : Tech et doc, 1991.
- PECHÈRE, J.-C., ACAR, J., ARMENGAUD, M., GRENIER, B., MOELLERING Jr. R., SANDE, M., WALDVOGEL, E., ZINNER, S. *Les infections*. 3^e édition. Paris : Maloine, 1994. 198 pages.
- OTENG-GYANGK. *Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds*. Paris : Technique et documentation (Lavoisier), 1984.
- SOROSTE, A. *Réglementation des produits, qualité, répression des fraudes – Tome 1 et 2*. Paris : Lamy-Dehove, février 2001.
- STUART, B., LEVY. *Le paradoxe des antibiotiques*. Paris : Belin, 1999.

Revue - catalogues

L'Opéron : revue de l'Union des professeurs de physiologie, biochimie et microbiologie. Lycée technique La Martinière, avenue Andreï Sakharov, La Duchère, 69338 Lyon cedex 09.

Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) : revue du ministère de la Santé. Imprimerie nationale – département diffusion, BP 637, 59506 Douai cedex.

Médecine et maladies infectieuses : 22-24, rue du Château des rentiers, 75013 Paris.

Catalogues de :

- l'Institut Pasteur : IPP, 36, rue du Docteur Roux, 75725 Paris cedex 15 ;
- l'Institut Mérieux. BioMérieux, Marcy l'Etoile , 69260 Charbonnières-les-Bains ;
- API System. API System, La Balme-les-Grottes, 38390 Montalieu-Vercieu.

Normes AFNOR. AFNOR, Tour Europe, cedex 7, 92080 Paris La Défense.

Journal officiel : 26, rue Dessaix, 75727 Paris cedex 15, pour divers extraits et les recueils :
- *Hygiène alimentaire*, 1996 ;
- *Toxi-infections alimentaires collectives*, 1988 (n°1487, 62 pages).

Notre alimentation. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, DGAL. 251, rue de Vaugirard, 75732 Paris 15.

Option qualité. Lamy Éditeurs.

Revue de l'association des diététiciens de langue française : 35, allées Vivaldi, 75012 Paris.

Cahiers de nutrition et diététique. Groupe SEPAIC, 42, rue du Louvre, 75002 Paris.

Biofutur : 29, rue Buffon, 75005 Paris.

Microbiologie et toxicologie des aliments

Hygiène et sécurité alimentaires

4^e édition

La réglementation européenne relative à l'hygiène des denrées alimentaires a récemment considérablement évolué. Les premiers textes d'envergure impliquant la responsabilisation active des professionnels dans la maîtrise des conditions d'hygiène inhérentes aux activités de production, de transformation, de conditionnement et de distribution réalisées par les entreprises furent les directives CEE 92-5 et CEE 93-43. L'expérience a montré qu'elle a permis d'assurer des bases communes pour la production hygiénique des aliments et leur sécurité. C'est sur ces textes que s'appuie l'actuelle édition de Microbiologie et toxicologie des aliments.

De nouvelles conceptions, plus transversales, ont été, depuis, développées et ont abouti le 12 janvier 2000 à l'adoption d'un livre blanc. Le travail communautaire conduit depuis a débouché sur l'élaboration et l'adoption d'un ensemble de textes qui sont regroupés sous le nom de « paquet hygiène » et qui constituent la référence actuelle en matière d'hygiène et de sécurité alimentaires.

Ce « paquet hygiène » vise donc à refondre, harmoniser et simplifier les dispositions en matière d'hygiène figurant jusqu'alors dans 17 directives communautaires verticales. Son objectif est de mettre en place une politique unique et transparente en matière d'hygiène sur l'ensemble de la Communauté européenne, applicables à toutes les denrées alimentaires et à tous les exploitants du secteur alimentaire. Cette nouvelle législation est entrée en vigueur pour l'ensemble de la chaîne alimentaire au 1er janvier 2006.

Cette nouvelle édition de l'ouvrage « Microbiologie et toxicologie alimentaire », profondément remaniée, intègre ces dernières évolutions réglementaires. Elle fait également l'objet d'une actualisation des données épidémiologiques et des connaissances les plus récentes sur les mécanismes physiopathologiques des toxi-infections alimentaires.

Ce livre concerne les étudiants préparant les BTS Diététique, BTS économie sociale et familiale, BTS Hôtellerie restauration, BTS Qualité dans les industries alimentaires et bio-industries, BTS Biochimiste, BTSA Industries agro-alimentaires, et le DUT génie biologique. Il s'adresse aussi aux professeurs enseignant dans ces sections ainsi qu'en baccalauréat professionnel Bio-industries de transformation, BEP Bioservices, BEP Carrières sanitaires et sociales, Baccalauréat STL Biochimie-génie biologique.

ISSN 1159-1102

doïn éditeurs

ISBN 978-2-7040-1233-6

ISSN 2-7040-0856-6

ISBN 978-2-86617-526-9

Réf. CRDP 330 9B 196

38 €



9 782704 012336



9 782866 175269