



anses

Evaluation des mesures de maîtrise en filière bovine lors de la détection de cas de botulisme

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Septembre 2021



CONNAÎTRE, ÉVALUER, PROTÉGER

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 23 septembre 2021

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

relatif à l'évaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits dans la filière bovine, lors de suspicion et de confirmation de cas de botulisme

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 25 juin 2019 par la Direction générale de l'alimentation (DGAL) pour la réalisation de l'expertise suivante : mise à jour des connaissances et évaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits dans la filière bovine, lors de suspicion et de confirmation de cas de botulisme.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le botulisme est une maladie neurologique humaine et animale provoquée par l'action de neurotoxines bactériennes (toxines botuliques) produites par des bactéries du genre *Clostridium* et qui se manifeste par des paralysies flasques pouvant aller jusqu'à la paralysie respiratoire et l'arrêt cardiaque. Il existe neuf types connus de toxines botuliques.

Le botulisme animal en France concerne essentiellement les oiseaux (sauvages et domestiques) et les bovins. Les cas chez les bovins sont dus aux types mosaïque D/C (majoritaire), C, C/D et rarement au D. Au niveau national, l'incidence observée les 10 dernières années est en moyenne d'une dizaine de foyers par an. Bien qu'il s'agisse d'une maladie animale de première catégorie¹, il n'y a pas à l'heure actuelle de mesures de police sanitaire établies par la réglementation, lors de la confirmation d'un foyer de botulisme animal, ce qui conduit à une gestion au cas par cas par les directions départementales de

¹ Le statut du botulisme animal est susceptible d'évoluer suite à l'entrée en vigueur de la Loi de Santé Animale (cf. section 2.3.1 du rapport)

la protection des populations (DDPP) et la mission des urgences sanitaires (MUS) de la DGAL. Ces services peuvent s'appuyer sur deux documents émis par l'Afssa : le rapport sur le botulisme animal établi en 2002 et l'avis rendu en janvier 2009 sur un projet d'arrêté fixant des mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre le botulisme aviaire. Les rapports et avis cités étant relativement anciens, la DGAL a saisi l'Anses *via* 4 saisines (saisines 2019-SA-0112 à 2019-SA-0115), dont l'objet est une demande d'actualisation des connaissances et des évaluations de risque pour la santé humaine et/ou animale.

L'expertise a été réalisée en deux étapes :

1. Une mise à jour des connaissances sur *Clostridium botulinum* (types C, D, mosaïques C/D et D/C et E) effectuée par le groupe de travail (GT) « Groupe socle botulisme », portant sur les caractéristiques microbiologiques, les maladies humaine et animale (bovins, oiseaux et poissons), la présence des différentes formes et types dans l'environnement, le danger dans les denrées alimentaires d'origine animale ainsi que l'efficacité des méthodes et procédés d'inactivation.
2. Le traitement des questions d'évaluation des risques par des groupes de travail spécifiques (« Botulisme bovin-aviaire » ; « Décontamination » ; « Faune sauvage et environnement »).

La présente saisine porte sur l'évaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits dans la filière bovine, lors de suspicion et de confirmation de cas de botulisme dans un troupeau. Les questions posées dans la saisine sont les suivantes :

- « Quel est le risque pour l'Homme lié à la consommation de produits carnés ou laitiers provenant d'un bovin en incubation ou atteint de botulisme ? Le risque est-il différent selon les souches bactériennes et la population concernée (nourrissons, enfants, adultes, personnes fragiles) ? Comment l'état de santé des animaux influence-t-il le risque pour le consommateur final (importance relative entre la phase d'incubation et la phase clinique) ?
- Quel est le risque potentiel associé aux produits carnés et laitiers issus des autres animaux du troupeau que ceux strictement malades ? Existe-t-il des moyens pour diminuer ce risque de contamination des produits ?
- La manipulation de carcasses en abattoir d'un animal issu d'un lot de bovins atteints de botulisme mais dépourvus de signes cliniques présente-t-elle un risque pour les employés de contracter le botulisme ? Comment le maîtriser ?
- Quelle est l'efficacité des différents traitements du lait sur les formes végétatives et sporulées (pasteurisation, traitement UHT, bactofugation, filtration membranaire) ? Dans quelle mesure peuvent-ils être considérés comme assainissant ? »

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise relève du domaine de compétences des comités d'experts spécialisés « Evaluation des risques biologiques dans les aliments (CES BIORISK, pilote) et « Santé et bien-être des animaux » (CES SABA). L'Anses a confié l'expertise au groupe de travail (GT) « Botulisme bovin - aviaire ». Les travaux ont été présentés tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques aux CES SABA (9 février, 11 mai et 6 juillet 2021) et BIORISK (9 février 2021, 19 mai 2021, 23 juin 2021). Ils ont été adoptés par le CES BIORISK réuni le 9 juillet 2021.

Les travaux du GT « Botulisme bovin – aviaire » s'appuient essentiellement sur la mise à jour des connaissances sur les types C, D, mosaïques C/D et D/C et E de *Clostridium botulinum* effectuée par

le GT « Groupe socle botulisme », complétée par d'autres sources documentaires listées dans la bibliographie.

Compte tenu de l'analyse du contexte sanitaire et décisionnel, des données scientifiques recueillies dans le cadre du rapport socle, le GT propose de fournir le résultat de l'expertise sous la forme d'un profil de risque sanitaire. Le profil de risque tel que défini par la Commission du *Codex Alimentarius* (CAC 2007) comporte notamment une description du danger et des aliments impliqués, des informations sur les lieux et moyens d'entrée du danger dans la chaîne de production alimentaire, la prévalence et concentration du danger dans les aliments considérés et l'efficacité des options de gestion des risques (Guillier 2017). Cette approche permet de fournir des informations susceptibles d'aider le gestionnaire dans sa prise de décision.

Aussi, les questions de la saisine ont été reformulées par le GT :

- Dans le cas d'un foyer de botulisme bovin, les produits issus d'animaux (lait, viande, abats) sont-ils susceptibles de contenir des formes végétatives/spores /toxines de *C. botulinum* ? Comment l'état de santé des animaux influence-t-il le niveau de contamination des produits ?
- Dans la filière viande bovine, les mesures appliquées de l'élevage à la consommation permettent-elles de maîtriser le danger dans les produits carnés ? Le cas échéant, existe-t-il des mesures supplémentaires pour diminuer l'exposition par les produits carnés ?
- La manipulation de la carcasse en abattoir d'un animal issu d'un lot de bovins atteints de botulisme mais dépourvus de signes cliniques présente-t-elle un risque pour les employés de contracter le botulisme ? Le cas échéant, comment le maîtriser ?
- Dans la filière bovine laitière, les mesures appliquées de l'élevage à la consommation permettent-elles de maîtriser le danger dans les produits laitiers ? Quelle est l'efficacité des différents traitements du lait sur les formes végétatives et sporulées (pasteurisation, traitement UHT, bactofugation, filtration membranaire) ? Le cas échéant, existe-t-il des mesures supplémentaires pour diminuer l'exposition par les produits laitiers ?

Dans ce cadre, le rapport d'expertise associé au présent avis rassemble :

1. Des éléments d'informations sur le danger, issues du rapport du GT socle :
 - Caractéristiques microbiologiques des *C. botulinum*
 - Caractéristiques de la maladie humaine et animale et les données épidémiologiques associées
 - La maîtrise des *C. botulinum* dans les denrées alimentaires d'origine animale (DAOA).
2. La détermination et l'évaluation des mesures de maîtrise des *C. botulinum* de types C, D, et mosaïques C/D et D/C tout au long de la filière bovine (de l'élevage à la consommation) lors de détection d'un foyer de botulisme bovin.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet : <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

3. SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS DES CES ET DU GROUPE DE TRAVAIL

3.1. Éléments d'information sur le danger

3.1.1. Caractéristiques de *Clostridium botulinum* et des toxines botuliques

C. botulinum, est constitué d'un ensemble de souches bactériennes dont le point commun est la capacité à synthétiser une toxine botulique, dont le mécanisme d'action est l'inhibition de la libération synaptique de l'acétylcholine, ce qui entraîne des paralysies pouvant conduire à la mort. Neuf types de toxines botuliques ont été identifiés (A, B, C, D, E, F, G, H et X). Les toxines botuliques se distinguent entre elles par des différences immunogéniques, de spécificité d'hôte, de cibles moléculaires et de toxicité. Il existe pour les types C et D des neurotoxines hybrides dites mosaïques C/D et D/C (Woudstra *et al.* 2012)

Les souches de *Clostridium* productrices de toxine botulique sont classées aujourd'hui en six groupes (groupes I à VI) en fonction de leurs caractéristiques biochimiques (notamment protéolytiques) et génétiques. La classification basée sur le type de toxine produite est actuellement la plus employée. Ce sont des bactéries sporulées telluriques et anaérobies stricts. La forme sporulée permet aux souches de résister lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables à la forme végétative. Elle confère également une résistance aux procédés physiques ou chimiques mis en œuvre par exemple lors d'un traitement thermique ou d'une désinfection. La synthèse des toxines botuliques est possible dans une très large variété de conditions environnementales et est favorisée par les mêmes conditions que celles favorisant la multiplication des cellules et *in fine* la production des spores.

La classification et les principales caractéristiques physiologiques des souches de *Clostridium* productrices de toxine botulique sont présentées dans le tableau 1 du rapport.

3.1.2. Maladie humaine

Le botulisme humain est une maladie rare pouvant être létale (de 1 à 10 % de décès selon les formes cliniques). Il existe plusieurs formes de botulisme selon le mode de contamination et d'exposition à la toxine :

- Le botulisme alimentaire résulte d'une intoxication par voie digestive due à la présence de la toxine préformée dans un aliment.
- Le botulisme intestinal est une toxi-infection due à l'ingestion de spores de *Clostridium botulinum*, suivie d'une germination, multiplication des cellules végétatives dans l'intestin et production de toxine *in situ*. Le botulisme par toxi-infection peut être observé (i) chez les nourrissons de moins de 12 mois en raison de leur flore intestinale, incomplètement constituée ou incomplètement fonctionnelle (botulisme infantile) et (ii) chez des adultes présentant un déséquilibre du microbiote (p. ex. à la suite d'une chirurgie digestive, d'une dépression immunitaire, d'une antibiothérapie prolongée) (botulisme infectieux de l'adulte).
- Le botulisme par blessure (d'inoculation) est une toxi-infection dont le mécanisme est identique à celui du tétanos. Les spores de *C. botulinum* peuvent contaminer les plaies, et en situation d'anaérobiose (cas d'une blessure profonde), la bactérie peut s'y développer et y produire de la toxine.
- Le botulisme par inhalation des toxines (forme très rare).

Le botulisme alimentaire et le botulisme infantile sont les deux formes les plus rencontrées chez l'Homme. Les signes cliniques associés aux différentes formes de botulisme, le diagnostic différentiel ainsi que le traitement sont présentés en détail dans le rapport socle (Anses 2021a). La gravité des

signes cliniques dépend de la quantité de toxine botulique absorbée et du type de toxine. Le botulisme de type A est considéré comme le plus sévère pour l'Homme.

Entre 2008 et 2018, l'incidence du botulisme humain en France a été en moyenne de 7,5 foyers/an et de 14,5 cas/an. Le botulisme d'origine alimentaire est la forme très majoritairement observée (82% des foyers sur la période). Les types de toxines botuliques en cause sont les types A et B puis E, occasionnellement F. Aucun foyer/cas de botulisme humain de type C, D ou mosaïques C/D et D/C n'a été recensé pendant la période. Les aliments les plus souvent impliqués sont des conserves et des produits de fabrication familiale ou artisanale. Les deux principales sources alimentaires sont le jambon cru et les conserves de légumes.

Les produits carnés d'origine bovine ont rarement été identifiés comme source de botulisme. En France, seuls deux foyers ont été identifiés : saucisse de bœuf et de volailles (type B) en 2003 (Espié *et al.* 2003) et viande hachée en sauce (*C. baratii* type F) en 2015 (Mazuet *et al.* 2017). S'agissant des produits laitiers, une revue de Lindström *et al.* (2010) ne rapporte que 20 foyers documentés de cas humains associés à des produits laitiers entre 1912 et 2007 dans le monde dont un en France en 1973. Les types incriminés sont A et B, aucune toxine de type C, D ou mosaïques n'est mentionnée.

Au regard d'une question de la saisine, une demande a été faite par le GT auprès des autorités de santé de plusieurs pays, concernant l'existence de cas de botulisme de plaie ou par inhalation chez des travailleurs en abattoir. Aucun des 19 pays² qui ont répondu n'avait recensé de tels cas.

3.1.3. Caractère zoonotique des types C, D et mosaïques C/D et D/C

Le caractère zoonotique des *C. botulinum* de types C, D et mosaïques a été évalué par le GT socle sur la base de l'examen des données épidémiologiques internationales (cas de botulisme humain liés à ces toxines) et des résultats d'essais *in vitro* et *in vivo* sur l'effet des toxines sur l'être humain.

Les données épidémiologiques disponibles permettent d'établir une relation causale entre l'exposition à la toxine botulique et/ou *Clostridium botulinum* de type C et la survenue de cas de botulisme humain (deux foyers confirmés dont l'un d'origine aviaire rapportés par la littérature internationale). Néanmoins, les sources de contamination n'ont pas été formellement confirmées et une incertitude faible demeure sur l'origine zoonotique de ces cas. S'agissant du type D, un seul foyer de botulisme alimentaire a été identifié dans le monde sur la période étudiée, pour lequel l'exposition à la toxine botulique de type D était suspectée.

Les cas de botulisme humain C et D sont donc rarissimes comparativement à ceux de types A, B, E et F. Plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer la quasi absence de cas humains liés aux types C, D, C/D, D/C : faible sensibilité de l'hôte, faible exposition humaine, défaut de surveillance. La faible sensibilité de l'être humain aux toxines C, D et mosaïques est l'hypothèse privilégiée. Les essais *in vivo* réalisés par injection intradermique montrant l'efficacité de la toxine (particulièrement la C), la faible sensibilité correspondrait à une faible absorption intestinale des toxines.

3.1.4. Maladie animale

En France, les foyers de botulisme bovin concernent dans la majorité des cas des élevages laitiers et sont dus aux types toxiques mosaïque D/C (majoritaire), C, mosaïque C/D et plus rarement au D. L'incidence sur les 10 dernières années est en moyenne d'une dizaine de foyers par an.

² Pays ayant répondu : Allemagne, Angleterre, Argentine, Autriche, Belgique, Bulgarie, Danemark, Écosse, États-Unis, Finlande, Estonie, Irlande, Italie, Lettonie, Luxembourg, Monaco, Pologne, Suède, Suisse.

En l'état actuel des connaissances, l'intoxication est le principal mode de contamination à l'origine des signes cliniques chez les bovins. C'est l'ingestion de toxines préformées au niveau de l'aliment, de l'eau ou de toute substance contaminée qui est à ce jour considérée comme la cause de survenue du botulisme. Les sources de contamination les plus souvent incriminées sont : du fumier de volailles, des cadavres d'animaux, des aliments mal conservés (défaut d'acidification des fourrages fermentés et/ou défaut d'hygiène par exemple), qui, dans des conditions d'anaérobiose propices à la croissance de ces bactéries, peuvent permettre la prolifération de *C. botulinum* et la production de la toxine botulique.

L'atteinte clinique des animaux se manifeste généralement par une paralysie ascendante dont l'évolution peut être plus ou moins rapide, entraînant très fréquemment la mort des animaux malades dans un laps de temps variable : de quelques heures à plusieurs jours.

Le portage digestif de *C. botulinum* par les bovins a pu être mis en évidence par diverses études en Europe chez des animaux présentant des signes cliniques frustes, guéris ou convalescents ou chez des animaux sans signes cliniques, issus d'élevages ayant connu ou non un épisode de botulisme.

Les données disponibles sur la présence de *C. botulinum* dans les tissus et sécrétions de bovins sont issues, dans leur majorité, des opérations de diagnostic portant soit sur des animaux malades, soit sur leur cadavre. Actuellement, le prélèvement d'un échantillon de foie après mort ou euthanasie des animaux suspects est systématiquement préconisé pour le diagnostic et permet souvent d'identifier la maladie. Très peu d'études ont porté sur d'autres tissus animaux et sur des bovins en période pré-symptomatique, convalescents ou non exposés. Les résultats sont présentés en section 2.3.5 du rapport.

3.1.5. *C. botulinum* et denrées alimentaires d'origine animale (DAOA)

La bibliographie concernant la prévalence et la maîtrise des *C. botulinum* du groupe III (types C, D et mosaïques C/D, D/C) dans les DAOA est très peu abondante. La majorité des travaux ont porté sur les souches des groupes I (protéolytiques types A et B) et II (non protéolytiques types B et E) qui sont majoritairement impliqués dans les cas humains.

La maîtrise des *C. botulinum* dans les DAOA est obtenue par l'action combinée de plusieurs mesures d'hygiène et de facteurs : traitement thermique, diminution de l' a_w (ajout de sel ou séchage), ajout de nitrites ou d'autres conservateurs, fumage, réfrigération et/ou limitation de la durée de vie (Lund et Peck 2013). L'état actuel des connaissances ne permet pas de remettre en cause la conclusion de Roberts et Gibson (1979) selon laquelle les mesures de maîtrise appliquées dans l'industrie agroalimentaire pour maîtriser les *C. botulinum* de types A et B seront efficaces pour les types C et D. Ceci semble pouvoir être affirmé pour les traitements thermiques des cellules végétatives et les spores. Les spores du groupe I sont souvent considérées comme une référence de « résistance ». Leur maîtrise par un procédé thermique permet la maîtrise des spores des souches des autres groupes, en particulier des souches du groupe III. Les toxines botuliques des types C et D semblent plus thermorésistantes que celles des types A, B, E. Cependant, des traitements thermiques supérieurs à 90 °C/2 min permettent l'inactivation totale de ces toxines.

La température, le pH ou l' a_w contrôlant la croissance des souches du groupe I (protéolytiques type A et B) permettront très vraisemblablement également le contrôle des souches du groupe III (Roberts et Gibson 1979), ces dernières présentant de moindres capacités à se développer à basse température, bas pH ou faible a_w .

3.2. Maîtrise des *C. botulinum* type C, D et mosaïques en filière bovine

Les mesures de gestion à appliquer dans un élevage bovin suspect ou atteint de botulisme ne sont actuellement pas définies réglementairement.

Les données scientifiques recueillies ne permettent pas de conduire une évaluation quantitative du risque lié aux produits carnés et laitiers issus de bovins en incubation ou atteints du botulisme. Afin d'aider le gestionnaire dans sa prise de décision, les experts ont procédé à l'évaluation des mesures de maîtrise du danger applicables tout au long de la filière bovine (de l'élevage à la consommation) lors de détection d'un foyer de botulisme bovin en suivant les étapes suivantes :

- évaluation qualitative de la probabilité d'émission du danger dans les tissus animaux (en fonction du statut clinique des animaux) ;
- identification des causes et des facteurs de risque de contamination des animaux, des produits carnés et laitiers ainsi que l'exposition des opérateurs ;
- évaluation des possibilités de contamination, de croissance et de toxinogenèse de *C. botulinum* de l'élevage à la consommation avec comme point de départ un foyer clinique ;
- évaluation de l'efficacité des mesures de maîtrise existantes vis-à-vis du danger.

Les bovins peuvent être atteints de botulisme de types B et A, plus dangereux pour l'Homme mais les foyers en élevage liés à ces types ne sont pas constatés en France. L'expertise s'est donc focalisée sur les types D, D/C, C et C/D.

Aussi, les réponses aux questions telles que reformulées par le GT sont les suivantes :

- **Dans le cas d'un foyer de botulisme bovin, les produits issus d'animaux (lait, viande, abats) sont-ils susceptibles de contenir des spores/toxines de *C. botulinum* ? Comment l'état de santé des animaux influence-t-il le niveau de contamination des produits ?**

Plusieurs statuts caractérisent les bovins appartenant à un cheptel atteint de botulisme : malades (présentant des signes cliniques de botulisme), futurs malades (en incubation), animaux convalescents (guéris cliniquement) et animaux qui resteront sans signes cliniques (ayant ingéré une quantité trop faible de toxine et/ou ne développant pas de toxi-infection ou non exposés si la contamination dans la source ingérée (aliment par exemple) n'est pas répartie de façon homogène.

Les produits issus d'animaux malades sont écartés de la chaîne alimentaire. De ce fait l'expertise a examiné le cas des animaux acheminés vers un abattoir ou dont le lait est collecté avant le signalement du cas index. Dans le laps de temps qui précède la détection du cas index. Tous les bovins ayant partagé le même aliment supposé contaminé doivent être considérés comme potentiellement en incubation. En tenant compte des délais possibles d'incubation, les autres bovins du cheptel peuvent également être en incubation.

Peu de données sont disponibles sur la présence du danger dans les tissus et sécrétions des bovins. À partir des quelques données disponibles, le GT a évalué qualitativement la probabilité de présence de spores, cellules végétatives et toxines de *C. botulinum* dans les produits et tissus manipulés à l'abattoir ou destinés à la consommation humaine (viandes, abats, lait) (cf. tableau 4 du rapport). Ainsi, les produits issus d'animaux sont susceptibles de contenir des spores, des cellules végétatives et des toxines de *C. botulinum* avec une prévalence et un niveau de contamination dépendant du statut clinique des animaux :

- le portage digestif de *C. botulinum* peut être détecté de manière transitoire et/ou intermittente dans des cheptels bovins apparemment sains à une prévalence estimée entre 1 et 4 %. Après distribution d'un aliment contaminé, en comparaison avec un élevage tout-venant, le taux de portage intestinal des spores de types C, D ou mosaïques sera plus important pour les bovins qu'ils soient en incubation ou qu'ils demeurent sans signes cliniques ;

- la présence de formes végétatives et de toxines dans le foie est largement démontrée par les opérations de diagnostic chez les bovins atteints de botulisme. La probabilité de présence de ces formes du danger dans le foie chez le bovin en incubation a été estimée comme élevée ;
 - en dehors du tissu hépatique, peu de données sont disponibles sur la présence du danger dans les viandes et abats issus d'un bovin présentant des signes cliniques et a fortiori chez ceux asymptomatiques mais en phase d'incubation ;
 - à l'abattoir, le contenu du tube digestif constitue une source de contamination directe ou indirecte de la carcasse durant les opérations d'habillage ;
 - les souillures fécales constituent également une source de contamination du lait au moment de la traite. Selon l'estimation réalisée par le GT, dans la situation la plus défavorable (50 % bovins porteurs asymptomatiques, limite de détection de 3 000 ufc de *C. botulinum* par g de matières fécales), la concentration en *C. botulinum* resterait inférieure à une valeur de l'ordre de 2 log ufc/l de lait de tank (le calcul donne une distribution de concentrations inférieures à 111 bactéries/litre de lait de tank dans 95 % des cas).
- **Dans la filière viande bovine, les mesures appliquées de l'élevage à la consommation permettent-elles de maîtriser le danger dans les produits carnés (issus d'animaux en incubation/animaux restant indemnes)? Le cas échéant, existe-t-il des mesures supplémentaires pour diminuer l'exposition par les produits carnés ?**

Au stade de l'élevage, les bonnes pratiques d'élevage et la mise en place de mesures de biosécurité permettent de prévenir à la fois la survenue d'un épisode de botulisme en élevage bovin, mais également la présence de *C. botulinum* dans l'environnement direct des animaux, en particulier :

- le renforcement de la biosécurité pour les élevages mixtes ;
- la surveillance de l'état de santé des animaux, par exemple via l'observatoire de la mortalité des animaux de rente (OMAR) ;
- le diagnostic vétérinaire précoce.

Pour limiter le risque que pourraient représenter les animaux porteurs sans signes cliniques, certaines mesures peuvent être renforcées pour tout animal de l'élevage suspect et/ou reconnu atteint conduit à l'abattoir, jusqu'à la maîtrise complète du foyer clinique :

- la propreté des animaux (revêtement cutané et phanères) ;
- la mise à la diète préalable de l'animal en fonction de l'horaire prévisible de son abattage (24 h avant) ;
- l'isolement de l'animal au cours du transport, ainsi que lors du déchargement et dans la stabulation de l'établissement d'abattage afin d'éviter les transferts de contamination entre lots ;
- l'inscription du botulisme dans les informations sur la chaîne alimentaire (ICA).

Enfin, les experts recommandent le maintien des enquêtes épidémiologiques faites par les DDPP lors de la détection d'un foyer, malgré le changement éventuel de la réglementation prévu en 2021 en application de la Loi de Santé Animale.

De la stabulation à la chambre froide (section 3.3 du rapport), il apparaît que les bonnes pratiques d'abattage et les bonnes pratiques d'hygiène (BPH) au sens large sont suffisantes pour maîtriser le transfert du danger à la viande, à la condition expresse de leur mise en œuvre effective et constante. À ce titre, toute démarche de management de l'hygiène permettant d'attester de cette mise en œuvre, comme les BPH surveillées, est recommandée. Les experts souhaitent néanmoins attirer l'attention sur certains points qui méritent une vigilance accrue pour les animaux issus d'un élevage où des signes cliniques de botulisme ont été suspectés/confirmés :

- l'inspection vétérinaire *ante mortem* qui doit inclure l'examen de signes cliniques pouvant évoquer le botulisme ;
- renforcer l'évaluation *ante mortem* de la propreté des animaux, qui devrait être estimée de façon objective et conduire à une pratique d'abattages logistiques ;
- la manipulation des foies et des réservoirs digestifs devrait être limitée et la valorisation alimentaire de ces abats exclue.

Au stade de la découpe, la conception hygiénique des ateliers et des équipements utilisés, ainsi que l'organisation des activités de découpe, sur la base de bonnes pratiques hygiéniques et de la démarche HACCP, sont de nature à maîtriser les transferts des spores éventuellement présentes, leur germination, la croissance des formes végétatives ainsi que la production de toxines. Les principaux points de vigilance sont le respect de la chaîne du froid et le nettoyage/désinfection des surfaces, matériels et équipements.

Les possibilités de croissance et de toxinogénèse de *C. botulinum* du groupe III ont été évaluées au cours de la transformation de trois produits carnés bovins : viande hachée, salaison sèche (type viande des grisons), terrine de foie (section 3.4.2 du rapport). Cette sélection a permis d'illustrer l'impact de différents procédés de transformation et de mesures de maîtrise sur *C. botulinum* : maîtrise de la chaîne du froid, séchage, ajout de sel et de conservateurs, traitement thermique, limitation de la durée de vie de l'aliment. L'application effective de ces mesures permet de maîtriser la croissance et la toxinogénèse *C. botulinum* du groupe III dans les produits carnés bovins.

- **La manipulation de la carcasse en abattoir d'un animal issu d'un lot de bovins atteint de botulisme mais dépourvu de signes cliniques présente-t-elle un risque pour les employés de contracter le botulisme ? Le cas échéant, comment le maîtriser ?**

L'exposition professionnelle des opérateurs tout au long des séquences transport-abattage concerne les chauffeurs, les bouviers et les opérateurs sur chaîne. Le GT a procédé à l'identification exhaustive des différentes possibilités d'exposition au regard des principaux modes de transmission (INRS) (cf. section 3.3 du rapport) :

- inoculation par blessure ou coupure avec des objets contaminés ;
- ingestion manuportée (port à la bouche des mains ou d'objets contaminés) ;
- inhalation de poussières sur le lieu de travail.

Il convient de noter qu'au regard de tous les modes de transmission, les personnes les plus exposées sont les éleveurs.

Toutes les possibilités d'exposition professionnelle sont présentées, même si leur survenue est hautement improbable. En effet, le contexte épidémiologique se traduit par l'absence de cas rapporté de botulisme en milieu professionnel tant en élevage qu'à l'abattoir. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la présence à l'abattoir de ce type d'animaux est peu fréquente, et/ou que, les bonnes pratiques d'hygiène sont suffisantes pour limiter l'exposition des opérateurs.

- Botulisme par inoculation

Toute manipulation d'objet coupant peut être considérée comme une voie potentielle d'exposition par inoculation à la suite d'une blessure ou d'une coupure avec un objet possiblement contaminé par des spores, des cellules végétatives ou des toxines. Les mesures de protection appliquées à l'abattoir permettent de limiter/maîtriser le risque de botulisme par coupure.

- Botulisme par inhalation

La nécessité que la toxine soit présente en grande quantité au niveau des muqueuses nasales des travailleurs en abattoir rend très improbable un botulisme par inhalation. L'inhalation seule de spores

ne causera pas cette forme de botulisme. En effet, les conditions d'anaérobiose nécessaires à la germination et à la production de toxine ne sont pas présentes dans les voies respiratoires. À la suite de l'inhalation de spores, il peut y avoir remontée mucociliaire puis déglutition de celles-ci. Mais seul un botulisme infectieux de l'adulte pourrait être envisagé par ce mécanisme. Les conditions médicales prédisposant à un botulisme infectieux de l'adulte sont incompatibles avec le travail à l'abattoir.

- Botulisme suite à l'ingestion de toxines (manuportées)

Les toxines provenant d'un animal en incubation pourraient être ingérées par les opérateurs par l'intermédiaire de mains souillées. L'application des BPH (le lavage des mains en particulier) permet de maîtriser ce risque.

- **Les mesures appliquées de l'élevage à la consommation permettent-elles de maîtriser le danger dans les produits laitiers ? Quelle est l'efficacité des différents traitements du lait sur les formes végétatives et sporulées (pasteurisation, traitement UHT, bactofugation, filtration membranaire) ? Le cas échéant, existe-t-il des mesures supplémentaires pour diminuer l'exposition par les produits laitiers ?**

Les principales causes de contamination du lait par *C. botulinum*, par transfert de matières fécales, au sein d'un élevage bovin atteint de botulisme, ainsi que les mesures de maîtrise associées sont présentées dans le tableau 8 du rapport. Ces mesures sont de nature à minimiser la contamination du lait cru par *C. botulinum* par les vaches ne présentant pas de signes cliniques.

Selon l'estimation du GT, même dans le scénario le plus défavorable envisagé (situation exceptionnelle d'un élevage avec 50 % d'animaux excréteurs), la concentration en *C. botulinum* dans le lait livré serait de l'ordre de 1 log ufc/l (la concentration dans le lait dans cette situation exceptionnelle resterait inférieure à 111 bactéries/litre de lait de tank dans 95 % des cas, situation à laquelle se rajoute un facteur 10 de dilution pour le lait de tank de grand mélange destiné à la transformation).

Le lait cru destiné à être consommé en l'état et les fromages au lait cru ont été exclus du périmètre de l'expertise au regard des données épidémiologiques et des résultats d'expertises antérieures de l'Agence. En effet, les températures de conservation et la durée de vie du lait cru à consommer en l'état ne permettent pas la germination des spores ni la croissance des cellules végétatives. Les fromages au lait cru n'ont pas été identifiés comme des aliments pertinents vis-à-vis de *C. botulinum* (Anses 2021b).

Aussi, les produits laitiers considérés par le GT sont les suivants : lait (pasteurisé, stérilisé, microfiltré), poudre de lait (incluant la poudre de lactosérum).

S'agissant de l'efficacité des procédés de traitement du lait sur les *C. botulinum* du groupe III (types C, D et mosaïques) :

- les barèmes définis pour les pasteurisations basse (63°C, 30 min) et haute (72°C, 15 s) du lait permettent l'inactivation totale des cellules végétatives, l'inactivation partielle des toxines mais n'ont pas d'effet sur les spores ;
- la stérilisation UHT (140 °C, 4 s ou toute autre combinaison équivalente) permet l'inactivation des spores, des cellules et des toxines ;
- la bactofugation et la filtration membranaire permettent d'éliminer physiquement (1 à 3 réductions décimales) les microorganismes du lait sans distinction, mais n'ont pas d'effet sur les exotoxines. La bactofugation et la filtration sont souvent couplées à une pasteurisation.

La succession des opérations de transformation pour obtenir les produits considérés (lait pasteurisé, microfiltré, bactofugé, poudre de lait) est de nature à réduire de manière significative la contamination initiale éventuelle (cf. figure 16 du rapport).

Enfin, le respect des conditions de conservation et de préparation des aliments par les consommateurs devrait limiter toute possibilité de croissance et de toxinogénèse à partir des éventuelles spores ayant échappé aux traitements.

S'agissant spécifiquement des préparations en poudres de nourrissons, la question du risque de botulisme infantile suite à l'ingestion de spores par des nourrissons de moins de douze mois se pose. Bien que des souches de *Clostridium* aient été détectées dans des poudres de lait - incluant les poudres infantiles - l'implication de poudres infantiles dans des cas de botulisme infantile n'a jamais été démontrée (FAO/WHO 2004, 2007; Doyle et al. 2015 ; Anses 2020a) et est estimée comme peu plausible, même avec une attention particulière pour les souches du groupe III. À ce jour, seul un cas de botulisme infantile de type C a été rapporté pour lequel une origine environnementale était suspectée.

La quasi-absence de cas de botulisme humain liés aux types C, D et mosaïques conforte les conclusions de l'évaluation. Les produits carnés et laitiers d'origine bovine ont rarement été identifiés comme source de botulisme et aucun cas lié aux types C, D ou mosaïques n'a été rapporté.

Les principales sources d'incertitudes ainsi que les modalités de leur prise en compte sont présentées en annexe 4 du rapport.

Le CES BIORISK émet des recommandations pour l'acquisition de données concernant plus particulièrement les points suivants :

- les transferts éventuels (type bactériémie digestive) des différentes formes de *C. botulinum* vers les torrents circulatoires (réalité, mécanismes et facteurs) ;
- l'effet des traitements physiques (et chimiques) de préservation des aliments au regard des différentes formes de *C. botulinum* (à confirmer en matrices alimentaires).

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions des CES BIORISK et SABA et du GT « Botulisme bovin-aviaire ».

En premier lieu, l'Agence note que, en France, les produits carnés et laitiers d'origine bovine ont très rarement été identifiés comme source de botulisme et que, pour les cas identifiés, aucune toxine de types C, D ou mosaïques C/D et D/C n'est en cause. En complément, entre 2008 et 2018, parmi les cas de botulisme humain recensés et dont l'incidence a été en moyenne de 14,5 cas/an, aucun cas n'a été attribué à ces types de toxine. Au niveau mondial, les cas de botulisme humain liés à ces types apparaissent rarissimes comparativement à ceux de types A, B, E et F.

Des données recueillies lors de l'expertise, aucun cas de botulisme en milieu professionnel, tant en élevage qu'à l'abattoir, n'a été rapporté.

En second lieu, l'Agence souligne que les données scientifiques ne permettent pas de conduire une évaluation quantitative du risque lié à la production de produits carnés et laitiers issus de bovins contaminés par *C. botulinum* de types C, D ou mosaïques C/D ou D/C. L'approche retenue a donc consisté à évaluer l'efficacité des mesures appliquées depuis l'élevage des animaux jusqu'à la consommation pour prévenir les contaminations et maîtriser le danger dans des produits potentiellement contaminés. Cette approche a fait l'hypothèse que, compte-tenu des mesures existantes de gestion des foyers de botulisme bovin, les animaux malades présentant des signes

cliniques caractéristiques de botulisme sont écartés dès le début de la chaîne, *a contrario* des animaux ne présentant pas de tels signes et qui peuvent être porteurs ou en incubation.

Tout au long de la chaîne alimentaire des produits carnés et laitiers, la mise en œuvre effective des mesures de biosécurité et des bonnes pratiques, notamment d'hygiène ainsi que l'application des différents procédés de transformation et de traitement devraient permettre de maîtriser le risque pour l'Homme lié à la consommation de tels produits provenant d'un bovin contaminé par *C. botulinum* de types C, D ou mosaïques C/D ou D/C.

Pour les professionnels travaillant en abattoir, l'application effective des mesures de protection et d'hygiène qui y sont prévues permet là aussi de maîtriser le risque lié à leur éventuelle contamination.

Ces conclusions s'accordent avec les données épidémiologiques présentées *supra*.

Toutefois, l'Agence souligne que les mesures de gestion à appliquer dans un élevage bovin suspect ou atteint de botulisme ne sont actuellement pas définies réglementairement. Une telle réglementation serait de nature à donner un caractère obligatoire à la mise en œuvre de ces mesures, renforçant de ce fait la maîtrise du danger aussi bien au niveau de l'élevage que dans la chaîne alimentaire.

En cas de foyer clinique dans un élevage et jusqu'à la maîtrise complète de celui-ci, grâce notamment aux opérations de décontamination qui y sont réalisées, la conduite à l'abattoir d'un animal sans signe clinique issu de cet élevage gagnerait à être accompagnée de mesures renforcées permettant de réduire davantage le risque de contamination des produits en aval de la chaîne. Parmi ces mesures, figurent la mise en propreté de l'animal avant son transport, sa mise à la diète préalablement à son abattage, son isolement pendant le transport et en stabulation et l'inspection vétérinaire *ante mortem*. De même, à l'abattoir, la manipulation de son foie et de son réservoir digestif devrait être limitée et leur valorisation alimentaire exclue.

Enfin, l'Agence souligne l'importance de maintenir les enquêtes épidémiologiques lors de la détection de foyer de botulisme en France, avec pour objectif d'améliorer les connaissances sur le cycle épidémiologique de *C. botulinum* en élevage et de recueillir des données sur la prévalence et la concentration dans les produits animaux (viandes, abats, lait).

Dr Roger GENET

Citation suggérée

Anses. (2021). Avis relatif à l'évaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits dans la filière bovine, lors de suspicion et de confirmation de cas de botulisme (saisine 2019-SA-0112) Maisons-Alfort : Anses, 12 p. Cet avis est associé à un rapport d'expertise collective.

Evaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits dans la filière bovine, lors de suspicion et de confirmation de cas de botulisme

**Saisine 2019-SA-0112 (filiale bovine)
Saisines liées 2019-SA-0112 à 2015 (Rapport socle Botulisme)**

**RAPPORT
d'expertise collective**

Comité d'experts spécialisé « Évaluation des risques biologiques dans les aliments »

Comité d'experts spécialisé « Santé et bien-être des animaux »

Groupe de travail « Botulisme bovin-aviaire »

Juillet 2021

Citation suggérée

Anses. (2021). Evaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits dans la filière bovine, lors de suspicion et de confirmation de cas de botulisme (saisine 2019-SA-0112) Maisons-Alfort : Anses, 112 p.

Mots clés

Botulisme ; *C. botulinum* du groupe III ; bovin ; viandes bovines ; produits laitiers.

Botulism; C. botulinum group III; cattle; bovine meat; dairy products.

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

GROUPE DE TRAVAIL

Président

M. Philippe FRAVALO - Professeur CNAM - hygiène et microbiologie des produits avicoles et porcins - caractérisation moléculaire des dangers biologiques - analyse métagénomique des écosystèmes complexes (flores contenus digestifs, flores en surface en industries agroalimentaires)

Membres

M. Michel FÉDÉRIGHI – Professeur Oniris (École vétérinaire de Nantes) - santé publique, aliments, hygiène, microbiologie, technologie, analyse des dangers, procédés d'inactivation

M. Jean-Pierre GANIÈRE - Retraité, Oniris (École vétérinaire de Nantes) - Microbiologie, biocides, maladies réglementées, évaluation des risques

M. Lionel GRISOT – Praticien Vétérinaire en Clinique vétérinaire - diagnostic, gestion en élevage, médecine vétérinaire

M. Didier HILAIRE - Adjoint au chef de la division Biologie, Centre d'études du Bouchet - DGA (Direction générale de l'armement) - type de *C. botulinum*, décontamination, aérobiocontamination

Mme Sophie LE BOUQUIN-LENEVEU - Chef d'unité adjointe, unité Épidémiologie, Santé et Bien-être (EPISABE), Laboratoire de Ploufragan/ Plouzané Anses - épidémiologie, analyse de données, santé travail

Mme Caroline LE MARÉCHAL-CONDY - Anses - Responsable du LNR botulisme aviaire, Ploufragan-Plouzané - botulisme aviaire et bovin, diagnostic

M. François MEURENS – Professeur Oniris (École vétérinaire de Nantes) - microbiologie, immunologie, médecine vétérinaire, vaccins

Mme Michèle TREMBLAY - Médecin conseil en maladies infectieuses et risques biologiques au travail, Direction de santé publique de Montréal - santé travail - risques professionnels - dangers - eaux usées

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

Les travaux, objets du présent avis ont été suivis et adoptés par les CES suivants :

■ **CES « Évaluation des risques biologiques dans les aliments » (BIORISK)**

Président

M. Philippe FRAVALO – Conservatoire National des arts et métiers, Professeur. Hygiène et microbiologie des aliments, méthodes de détection, de quantification et de caractérisation des micro-organismes, écologie des écosystèmes microbiens en agro-alimentaire

Membres

Frédéric AUVRAY – École nationale vétérinaire de Toulouse, Ingénieur de recherche. Biologie moléculaire, génétique microbienne, bactériologie

M. Mickaël BONI (à partir de juin 2021) Institut de recherche biomédicale des armées, vétérinaire en chef – Chef d'unité. Microbiologie, hygiène, salubrité et qualité des aliments, zoonose et infectiologie, sûreté sanitaire des aliments et de l'eau, inspection en sécurité sanitaire des aliments, traitement et contrôle sanitaire des EDCH

M. Frédéric CARLIN – INRAE, Directeur de recherche. Bactéries sporulées, produits végétaux, microbiologie prévisionnelle

Mme Catherine CHUBILLEAU – Centre hospitalier de Niort, Chef de service. Épidémiologie, évaluation des risques sanitaires, hygiène

Mme Florence DUBOIS-BRISSONNET – AgroParisTech, Professeur des universités. Microbiologie des aliments, biofilms, mécanismes d'adaptation des microorganismes au stress (conservateurs, désinfectants)

M. Steven DURET – Irstea, Ingénieur de recherche. Modélisation, génie des procédés, transfert thermique

M. Michel FÉDÉRIGHI – Oniris (École vétérinaire de Nantes) - Professeur des universités. Microbiologie, hygiène et qualité des aliments, analyse des dangers

Mme Michèle GOURMELON (à partir de juin 2021) – IFREMER, Chargée de recherche. Bactériologie, biologie moléculaire, écologie microbienne – *Campylobacter*, bactéries du continuum terre-mer et bactéries marines

M. Michel GAUTIER – Agrocampus Ouest, Professeur des universités. Microbiologie et hygiène des aliments, biologie moléculaire, bactériophages, aliments fermentés

M. Stéphane GUYOT – AgroSup Dijon, Maître de conférences. Procédés de destruction des bactéries pathogènes, mécanismes d'adaptation aux stress environnementaux

Mme Nathalie JOURDAN-DA SILVA – Santé publique France, Chargée de projet scientifique. Épidémiologie des maladies entériques et zoonoses

M. Renaud LAILLER – Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Chef de projet. Surveillance, *Salmonella*, hygiène des aliments

M. Bertrand LOMBARD (à partir de juin 2021) – Anses, Direction de la Stratégie et des Programmes, Chef de projet. Analyse microbiologique des aliments, activités de référence, normalisation

Mme Sandra MARTIN-LATIL – Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Chargée de projet scientifique. Virologie, méthodes de détection

Mme Florence MATHIEU – Toulouse-INP/ENSAT, Professeur des universités. Moisissures et mycotoxines, microbiologie des aliments

Mme Jeanne-Marie MEMBRÉ – INRAE, Ingénieur de recherche. Appréciation quantitative du risque microbiologique, statistiques appliquées.

M. Éric OSWALD – CHU Toulouse, Professeur des universités. Infectiologie clinique, écologie microbienne, *E. coli*

M. Pascal PIVETEAU (à partir de juin 2021) – INRAE. Écologie microbienne, Écologie des bactéries pathogènes dans les agroenvironnements

Mme Sabine SCHORR-GALINDO – Université Montpellier, Professeur des universités. Mycologie, écologie microbienne, biotechnologie

Mme Nalini RAMA RAO – INRAE, Directrice de recherche. Microbiologie, interaction hôte/pathogène, microbiote intestinal

Mme Régine TALON – INRAE, Directrice de recherche. Microbiologie des aliments, écologie microbienne, aliments fermentés d'origine animale

Mme Muriel THOMAS – INRAE, Directrice de recherche. Microbiote intestinal et santé humaine, physiologie

Mme Isabelle VILLENA – CHU Reims, Professeur des universités. Parasitologie, infectiologie

■ CES « Santé et Bien-être de animaux » (SABA)

Président

M. Gilles MEYER – Professeur, École nationale vétérinaire de Toulouse - virologie, immunologie, vaccinologie, maladies des ruminants

Membres

Mme Catherine BELLOC – Professeur, Oniris (Ecole Vétérinaire de Nantes) - infectiologie, approche intégrée de la santé animale, maladies des monogastriques

M. Stéphane BERTAGNOLI – Professeur, École nationale vétérinaire de Toulouse - virologie, immunologie, vaccination, maladies des lagomorphes

M. Alain BOISSY – Directeur de Recherche INRAE Clermont-Ferrand – Theix - bien-être animal

M. Henri-Jean BOULOUIS – Professeur, École Nationale Vétérinaire d'Alfort - bactériologie, diagnostic de laboratoire, immunologie, vaccinologie

M. Éric COLLIN – Vétérinaire libéral - médecine vétérinaire, médicament vétérinaire, maladies vectorielles, maladies à prion, épidémiologie, maladies des ruminants

M. Jean-Claude DESFONTIS – Professeur, Oniris (Ecole Vétérinaire de Nantes) – physiologie animale, bien-être animal, médicament vétérinaire

Mme Maria-Eleni FILIPPITZI – Vétérinaire épidémiologiste, SCIENSANO (B) – épidémiologie quantitative, évaluation de risque

M. David FRETIN – Chef de service de bactériologie vétérinaire. SCIENSANO (B) - bactériologie, zoonoses, diagnostic de laboratoire, LNR tuberculose en Belgique

Mme Emmanuelle GILOT-FROMONT – Professeur, VetAgro Sup – Campus vétérinaire de Lyon – épidémiologie quantitative, évaluation de risque, interface faune sauvage-animaux domestiques, maladies réglementées

M. Étienne GIRAUD – Chargé de recherche, INRAE Toulouse – bactériologie, antibiorésistance, maladies des poissons

M. Lionel GRISOT – Vétérinaire libéral - médecine vétérinaire, médicament vétérinaire, maladies des ruminants

Mme Nadia HADDAD – Professeur, École Nationale Vétérinaire d'Alfort - infectiologie, maladies réglementées, zoonoses

Mme Viviane HENAUX – Cheffe d'unité adjointe, Unité Épidémiologie et appui à la surveillance, Anses Lyon – épidémiologie quantitative, évaluation de risque

Mme Elsa JOURDAIN – Chargée de recherche, INRAE Clermont-Ferrand - Theix - zoonoses, épidémiologie, interface faune sauvage-animaux domestiques

Mme Sophie LE BOUQUIN - LENEVEU – Cheffe d'unité adjointe, Unité Épidémiologie, santé et bien-être, Anses Ploufragan-Plouzané-Niort - épidémiologie, évaluation de risque, approche intégrée de la santé animale

Mme Sophie LE PODER – Maître de conférences, École Nationale Vétérinaire d'Alfort - virologie, immunologie, vaccinologie

Mme Élodie MONCHATRE-LEROY – Directrice du Laboratoire de la rage et de la faune sauvage, Anses Nancy - virologie, épidémiologie, évaluation de risques, faune sauvage

Mme Monique L'HOSTIS – Retraitée, Oniris (École vétérinaire de Nantes) – Parasitologie, santé des abeilles

M. François MEURENS – Professeur, Oniris (École vétérinaire de Nantes) - virologie, immunologie, vaccinologie, pathologie porcine

Mme Virginie MICHEL – Coordinatrice nationale bien-être animal - Anses - bien-être animal, approche intégrée de la santé animale, épidémiologie, évaluation de risque

M. Pierre MORMEDE – Directeur de recherche émérite INRAE - bien-être animal, stress

M. Hervé MORVAN – Chef de service du laboratoire de bactériologie vétérinaire, Labocéa 22 - bactériologie, diagnostic de laboratoire

Mme Carine PARAUD – Chargée de projet de recherche en parasitologie, Anses Ploufragan-Plouzané-Niort – parasitologie, maladies des ruminants

Mme Ariane PAYNE – Chargée d'étude, ONCFS - épidémiologie, évaluation de risque, interface faune sauvage-animaux domestiques

M. Michel PEPIN – Professeur, VetAgro Sup – Campus vétérinaire de Lyon – infectiologie, immunologie, vaccinologie, maladies des ruminants

Mme Carole PEROZ – Maître de conférences, Oniris (Ecole Vétérinaire de Nantes) - infectiologie, maladies réglementées, approche intégrée de la santé animale

Mme Claire PONSART – Chef de l'unité des zoonoses bactériennes, Laboratoire de Santé Animale, Anses Maisons-Alfort - bactériologie, zoonoses, diagnostic de laboratoire

M. Claude SAEGERMAN – Professeur, Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège - épidémiologie, évaluation de risque

Mme Gaëlle SIMON – Cheffe d'unité adjointe, Unité Virologie immunologie porcines, Anses Ploufragan-Plouzané-Niort - virologie, immunologie, maladies des monogastriques

M. Jean-Pierre VAILLANCOURT – Professeur, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal - épidémiologie, biosécurité, zoonose, évaluation de risque

PARTICIPATION ANSES

La coordination scientifique du projet a été assurée de manière transversale par l'Unité d'Évaluation des Risques liés aux Aliments (UERALIM) et l'Unité d'évaluation des risques liés à la santé, à l'alimentation et au bien-être des animaux (UERSABA) sous la direction de M. Moez SANAA (chef d'unité UERALIM), Mme Nathalie ARNICH (adjointe au chef d'unité UERALIM) et de Mme Charlotte Dunoyer (Cheffe d'unité UERSABA).

Coordination et contribution scientifique

Mme Pauline KOOH – Cheffe de projets scientifiques, UERALIM, Direction de l'Évaluation des Risques

M. Laurent GUILLIER – Chef de projets scientifiques et techniques, UERALIM, Direction de l'Évaluation des Risques

Mme Karine PETIT – Cheffe de projet scientifique, UERSABA, Direction de l'Évaluation des Risques

Secrétariat administratif

Mme Angélique LAURENT – Direction de l'Évaluation des Risques

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

Direction générale de l'alimentation (DGAL)

Mme Séverine RAUTUREAU – Mission des urgences sanitaires

M. Frédéric BERTASSI - Référent national Lait et produits laitiers

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations.....	10
Liste des tableaux	11
Liste des figures.....	12
1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise.....	13
1.1 Contexte	13
1.2 Objet de la saisine	13
1.2.1 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation	14
1.3 Prévention des risques de conflits d'intérêts	15
2 Éléments d'information sur le danger.....	16
2.1 Caractéristiques de <i>Clostridium botulinum</i> et des toxines botuliques	16
2.1.1 Classification des toxines botuliques et des souches productrices	16
2.1.2 Caractéristiques microbiologiques.....	17
2.1.3 Caractéristiques des toxines botuliques	20
2.2 Maladie humaine	21
2.2.1 Généralités, signes cliniques et aspects épidémiologiques	21
2.2.2 Données de surveillance humaine.....	24
2.2.3 Évaluation du caractère zoonotique des <i>Clostridium botulinum</i> du groupe III (types C, D, et mosaïques).....	26
2.3 Maladie animale.....	29
2.3.1 Aspects réglementaires.....	29
2.3.2 Données de surveillance relatives au botulisme bovin en France.....	29
2.3.3 Cycle épidémiologique en élevage bovin.....	33
2.3.4 Pathogénèse et signes cliniques chez les bovins	36
2.3.5 Présence et concentration dans les tissus animaux	37
2.4 Denrées alimentaires d'origine animale (DAOA).....	43
2.4.1 Prévalence, croissance et toxinogénèse dans les produits laitiers et carnés	43
2.4.2 Impact des procédés de transformation/production en filière bovine	45
3 Maîtrise des <i>C. botulinum</i> de types C, D et mosaïques en filière viande bovine	54
3.1 Élevage en filière viande bovine	54
3.1.1 Rappel des sources de contamination.....	54
3.1.2 Gestion des foyers de botulisme bovin.....	54
3.1.3 Mesures de réduction du risque de botulisme bovin en élevage.....	56

3.2	Parties du corps, tissus et sécrétions présentant une probabilité d'émission du danger représenté chez les bovins par <i>C. botulinum</i> et la toxine botulique.....	57
3.3	Transport et abattage : analyse des voies de contamination de la viande et d'exposition professionnelle des opérateurs par <i>C. botulinum</i>	59
3.3.1	Introduction et méthodologie du GT	59
3.3.2	L'abattage - Description chronologique synthétique	61
3.3.3	Cas du 5 ^e quartier	66
3.3.4	Synthèse des possibilités de transfert et des mesures de maîtrise pour le transport et l'abattage	67
3.4	Transformation.....	76
3.4.1	Découpe/désossage.....	77
3.4.2	Troisième transformation.....	79
4	Maîtrise des <i>C. botulinum</i> de types C, D et mosaïques en filière laitière bovine	83
4.1	Élevage de production laitière.....	83
4.1.1	Causes de contamination du lait par les matières fécales	83
4.1.2	Estimation de la concentration en <i>C. botulinum</i> dans le lait de tank	85
4.2	Collecte/ transport du lait cru	86
4.3	Transformation.....	87
5	Conclusions du groupe de travail	91
6	Bibliographie.....	96
	Annexe 1 : Lettre de saisine	106
	Annexe 2 : Diagramme de détermination des causes de Contamination du lait par les matières fécales (MF) des bovins lors de la traite	108
	Annexe 3 : Distribution des niveaux de contamination dans les matières fécales estimée à partir de la prévalence observée.....	109
	Annexe 4 : ANALYSE DES INCERTITUDES	110

Sigles et abréviations

AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ANMV	Agence Nationale du Médicament Vétérinaire
APMS	Arrêté préfectoral de mise sous surveillance
APDI	Arrêté préfectoral de déclaration d'infection
ATU	Autorisation temporaire d'utilisation
BoNT	<i>Botulinum Neuro Toxin – Neurotoxine botulique</i>
CNR	Centre National de Référence
DDPP	Direction Départementale de la Protection des Populations
DGAL	Direction Générale de l'Alimentation
DO	Déclaration Obligatoire (législation)
FAF	Fabrication d'Aliment à la Ferme
GDS	Groupement de défense sanitaire
IU	International Units (Unité internationale)
LNR	Laboratoire National de Référence
MLD50	(<i>Mouse Lethal Dose</i>) Dose létale médiane chez la souris
MUS	Mission des Urgences Sanitaires
NTNH	Non toxique Non Hémagglutinante
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment Receptor</i>

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification et caractéristiques physiologiques des <i>C. botulinum</i> et des espèces de <i>Clostridium</i> neurotoxigènes en conditions de laboratoire (adapté de Peng Chen <i>et al.</i> (2012), Lund et Peck (2013), Popoff (2017), Moore et Lacey (2019), Anses (2020b))	19
Tableau 2 : Présentation par ordre d'importance décroissante des principales sources et véhicules de contamination de <i>C. botulinum</i> (forme sporulée, végétative et toxine) dans un élevage de bovins	35
Tableau 3 : Impact des procédés d'inactivation et d'élimination microbienne applicables aux DAOA sur <i>C. botulinum</i>	53
Tableau 4 : Probabilité de présence de <i>C. botulinum</i> (cellule, spore, toxine) dans différents tissus animaux en fonction du statut clinique	58
Tableau 5 : Principaux constituants du triptyque de maîtrise de <i>C. botulinum</i> à l'abattoir	60
Tableau 6 : Tableau de maîtrise des <i>C. botulinum</i> de types C, D et mosaïques en filière viande bovine	68
Tableau 7 : Impact des quatre scénarios de cuisson de la terrine de foie sur les différentes formes de <i>C. botulinum</i> du groupe III	82
Tableau 8 : Principales causes de contamination du lait par <i>Clostridium botulinum</i> et mesures de maîtrise associées dans un élevage bovin atteint de botulisme	85
Tableau 9 : 95 ^e percentile des niveaux de contamination en <i>C. botulinum</i> (en bactérie/litre) dans les laits de tank pour des exploitations de 100 vaches laitières, estimation réalisée par le GT à partir des données de Souillard <i>et al.</i> (2015).	86
Tableau 10 : Récapitulatif de l'impact des procédés applicables en filière laitière bovine sur les différentes formes de <i>C. botulinum</i> du groupe III	89

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de la structure des toxines botuliques C, D, C/D et D/C (Woudstra <i>et al.</i> 2012).....	17
Figure 2 : Schéma du mode d'action des toxines botuliques dans les neurones (en jaune sur le schéma).....	21
Figure 3 : Répartition des foyers de botulisme alimentaire avec identification de la source alimentaire (n = 41) en France entre 2008 et 2018 en fonction du type de préparation, de la nature de l'aliment, de l'origine des aliments et du type de toxine botulique.	25
Figure 4 : Répartition des foyers botuliques recensés de 2009 à 2019 par catégorie d'espèce (n = 592).....	30
Figure 5 : Évolution du nombre de foyers de botulisme pour les bovins recensés de 2009 à 2019 (n = 120).....	30
Figure 6 : Répartition des types de botulisme pour les foyers de bovins recensés de 2010 à 2019 (n = 118).....	31
Figure 7 : Répartition des foyers de botulisme bovin recensés de 2017 à 2019 (n = 36)	32
Figure 8 : Répartition des foyers de botulisme par espèce et par pays (n = 114).....	33
Figure 9 : Véhicules d'introduction de <i>C. botulinum</i> (forme sporulée, végétative et toxines) dans un élevage de bovins.....	34
Figure 10 : Représentation schématique des relations entre la température appliquée et les valeurs du temps de réduction décimale D (minutes) pour les spores de <i>C. botulinum</i> de type I (protéolytiques) (trait plein) (Diao, Andre et Membre 2014), de type II (non protéolytiques) (tirets) (Wachnicka <i>et al.</i> 2016), des fractions de populations de spores du type II résistantes à la chaleur en présence de lysozyme (pointillés) (Wachnicka <i>et al.</i> 2016), et du type III, avec représentation des données individuelles (points) issues de Segner (Segner et Schmidt 1971)	47
Figure 11 : Les différents procédés de filtration du lait.....	51
Figure 12 : Les trois états du tissu musculaire <i>post mortem</i>	59
Figure 13 : Principales sources et voies de contamination de la viande (flèches noires) et d'exposition des opérateurs (flèches grises) du transport à l'abattage ;.....	75
Figure 14 : Représentation schématique d'un atelier de découpe	78
Figure 15 : (a) Cinétique d'évolution de l'activité de l'eau au cours des premières phases de fabrication (cinétique inspirée de Lorenzo (2014) et Karolenko <i>et al.</i> (2020)) (b) Probabilité de croissance de <i>Clostridium botulinum</i> d'après le <i>Danish Meat Research Institute</i> (DMRI)	80
Figure 16 : Impact des opérations de transformation des produits laitiers considérés sur les différentes formes de <i>C. botulinum</i> du groupe III	90

1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise

1.1 Contexte

Le botulisme est une maladie neurologique humaine et animale provoquée par l'action de neurotoxines bactériennes (toxines botuliques) produites par des bactéries du genre *Clostridium* et qui se manifeste par des paralysies flasques pouvant aller jusqu'à la paralysie respiratoire et l'arrêt cardiaque. Il existe neuf types connus de toxines botuliques.

Le botulisme animal en France concerne essentiellement les oiseaux (sauvages et domestiques) et les bovins. Les cas chez les bovins sont dus aux types mosaïque D/C (majoritaire), C, C/D et rarement au D. Au niveau national, l'incidence observée les 10 dernières années est en moyenne d'une dizaine de foyers par an. Bien qu'il s'agisse d'une maladie animale de première catégorie en santé animale¹, il n'y a pas à l'heure actuelle de mesures de police sanitaire établies par la réglementation, lors de la confirmation d'un foyer de botulisme animal, ce qui conduit à une gestion au cas par cas par les directions départementales de la protection des populations (DDPP) et la mission des urgences sanitaires (MUS) de la Direction générale de l'Alimentation (DGAL). Ces services peuvent s'appuyer sur deux documents émis par l'Afssa : le rapport sur le botulisme animal établi en 2002 et l'avis rendu en janvier 2009 sur un projet d'arrêté fixant des mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre le botulisme aviaire. Les rapports et avis cités étant relativement anciens, la DGAL a saisi l'Anses *via* 4 saisines (saisines 2019-SA-0112 à 2019-SA-0115), dont l'objet est une demande d'actualisation des connaissances et des évaluations de risque pour la santé humaine et/ou animale.

1.2 Objet de la saisine

L'expertise a été réalisée en deux étapes :

1. Une mise à jour des connaissances sur *Clostridium botulinum* (types C, D, mosaïques C/D et D/C et E) effectuée par le groupe de travail (GT) « Groupe socle botulisme », portant sur les caractéristiques microbiologiques, les maladies humaine et animales (bovins, oiseaux et poissons), la présence des différentes formes et types dans l'environnement, le danger dans les denrées alimentaires d'origine animale ainsi que l'efficacité des méthodes et procédés d'inactivation.
2. Le traitement des questions d'évaluation des risques par des groupes de travail spécifiques (« Botulisme bovin-aviaire » ; « Décontamination » ; « Faune sauvage et environnement »).

La présente saisine porte sur l'évaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits dans la filière bovine, lors de suspicion et de confirmation de cas de botulisme dans un troupeau. Les questions posées dans la saisine sont les suivantes :

- « Quel est le risque pour l'Homme lié à la consommation de produits carnés ou laitiers provenant d'un bovin en incubation ou atteint de botulisme ? Le risque est-il différent selon les souches bactériennes et la population concernée (nourrissons, enfants, adultes, personnes fragiles) ? Comment l'état de santé des animaux influence-t-il le risque pour le consommateur final (importance relative entre la phase d'incubation et la phase clinique) ?

¹ Le statut du botulisme animal est susceptible d'évoluer suite à l'entrée en vigueur de la Loi de Santé Animale (cf. section 2.3.1)

- Quel est le risque potentiel associé aux produits carnés et laitiers issus des autres animaux du troupeau que ceux strictement malades ? Existe-t-il des moyens pour diminuer ce risque de contamination des produits ?
- La manipulation de carcasses en abattoir d'un animal issu d'un lot de bovins atteints de botulisme mais dépourvus de signes cliniques présente-t-elle un risque pour les employés de contracter le botulisme ? Comment le maîtriser ?
- Quelle est l'efficacité des différents traitements du lait sur les formes végétatives et sporulées (pasteurisation, traitement UHT, bactofugation, filtration membranaire) ? Dans quelle mesure peuvent-ils être considérés comme assainissant ? »

1.2.1 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'Anses a confié l'expertise au groupe de travail (GT) « Botulisme bovin - aviaire » rattachés aux comités d'experts spécialisés « Evaluation des risques biologiques dans les aliments (CES BIORISK, pilote) et « Santé et bien-être des animaux » (CES SABA). Les travaux ont été présentés tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques aux CES SABA (9 février, 11 mai et 6 juillet 2021) et BIORISK (9 février 2021, 19 mai 2021, 23 juin 2021). Ils ont été adoptés par le CES BIORISK réuni le 9 juillet 2021.

Ces travaux sont ainsi issus de plusieurs collectifs d'experts aux compétences complémentaires.

Les travaux du GT « Botulisme bovin – aviaire » s'appuient essentiellement sur la mise à jour des connaissances sur les types C, D, mosaïques C/D et D/C et E de *Clostridium botulinum* effectuée par le GT « Groupe socle botulisme » complétées par d'autres sources documentaires listées dans la bibliographie.

Compte tenu de l'analyse du contexte sanitaire et décisionnel, des données scientifiques recueillies dans le cadre du rapport socle, le GT propose de fournir le résultat de l'expertise sous la forme d'un profil de risque sanitaire. Le profil de risque tel que défini par la Commission du *Codex Alimentarius* (CAC 2007) comporte notamment une description du danger et des aliments impliqués, des informations sur les lieux et moyens d'entrée du danger dans la chaîne de production alimentaire, la prévalence et concentration du danger dans les aliments considérés et l'efficacité des options de gestion des risques (Guillier 2017). Cette approche permet de fournir des informations susceptibles d'aider le gestionnaire dans sa prise de décision.

Aussi, les questions de la saisine ont été reformulées par le GT :

- Dans le cas d'un foyer de botulisme bovin, les produits issus d'animaux (lait, viande, abats) sont-ils susceptibles de contenir des formes végétatives/spores /toxines de *C. botulinum* ? Comment l'état de santé des animaux influence-t-il le niveau de contamination des produits ?
- Dans la filière viande bovine, les mesures appliquées de l'élevage à la consommation permettent-elles de maîtriser le danger dans les produits carnés ? Le cas échéant, existe-t-il des mesures supplémentaires pour diminuer l'exposition par les produits carnés ?
- La manipulation de carcasses en abattoir d'un animal issu d'un lot de bovins atteints de botulisme mais dépourvus de signes cliniques présente-t-elle un risque pour les employés de contracter le botulisme ? Le cas échéant, comment le maîtriser ?
- Dans la filière bovine laitière, les mesures appliquées de l'élevage à la consommation permettent-elles de maîtriser le danger dans les produits laitiers ? Quelle est l'efficacité des différents traitements du lait sur les formes végétatives et sporulées (pasteurisation, traitement UHT, bactofugation, filtration membranaire) ? Le cas échéant, existe-t-il des mesures supplémentaires pour diminuer l'exposition par les produits laitiers ?

1.3 Prévention des risques de conflits d'intérêts

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

2 Éléments d'information sur le danger

2.1 Caractéristiques de *Clostridium botulinum* et des toxines botuliques

2.1.1 Classification des toxines botuliques et des souches productrices

Clostridium botulinum appartient au genre *Clostridium* qui est affilié à la famille des *Clostridiaceae*, ordre des *Clostridiales*, classe des *Clostridia* et division des *Firmicutes*. Le genre *Clostridium* est constitué d'environ 200 espèces dont une quinzaine synthétisent des toxines entraînant des maladies chez l'être humain et/ou l'animal (Poulain et Popoff 2019). Ainsi, *Clostridium botulinum* est constitué d'un ensemble de souches bactériennes du genre *Clostridium* dont le point commun est la capacité à synthétiser une toxine protéique appelée la toxine botulique. Les *Clostridium botulinum* sont classés en trois groupes (I, II, et III) en fonction de leurs propriétés biochimiques et plus particulièrement en fonction de leurs propriétés protéolytiques (cf. tableau 1). Pour ces trois groupes, il existe également des espèces de *Clostridium* qui correspondent à des bactéries biochimiquement très proches des *Clostridium botulinum* mais qui ne produisent pas de toxine botulique. Ces espèces sont rattachées à la classification par groupe des *Clostridium botulinum*. D'autres espèces du genre *Clostridium*, autres que *C. botulinum*, présentent des souches qui produisent aussi des toxines botuliques et constituent les groupes IV², V et VI (cf. tableau 1) des *Clostridium* producteurs de toxine botulique.

Les *Clostridium* producteurs de toxine botulique sont aussi classés en fonction du type de toxine qu'ils produisent. Neuf types de toxines botuliques ont été identifiés (A, B, C, D, E, F, G, H et X) mais seuls sept types (A à G) sont pris en compte pour la classification des *Clostridium botulinum* car les toxines de type H et X sont produites avec un autre type de toxine qui est majoritaire. Le tableau 1 (page 19) donne la correspondance entre les groupes et les types toxiniques. De façon générale, la classification liée au type de toxine produite est la plus employée. Cette approche prend aussi en compte le fait que différentes souches de *Clostridium botulinum* sont capables de produire simultanément deux ou trois types de toxine, le plus souvent avec des taux de production différents selon les toxines. Le type de la toxine produite majoritairement est indiqué en lettre majuscule et le type de la toxine minoritairement produite est indiqué en minuscule. Sont ainsi classifiées des souches de *Clostridium botulinum* Ba, Bf, Ab, Af, Bx, Bh et autres. Ces souches appartiennent généralement au groupe I des *Clostridium botulinum* (Barash et Arnon 2014; Zhang *et al.* 2018; Poulain et Popoff 2019).

Il existe, au sein de certains types, différents sous-types qui se distinguent entre eux par leurs séquences primaires, fruits de mutations dans le gène codant. Les types A, B et F comptent 8 sous-types chacun, le type E 12 sous-types. Aucun sous-type n'a été mis en évidence pour les types C, D, G, H et X, mais il existe pour les types C et D des toxines hybrides dites mosaïques C/D et D/C (Woudstra *et al.* 2012). La toxine mosaïque C/D est ainsi constituée de la chaîne légère de la toxine de type C et de la chaîne lourde de la toxine de type D. La toxine mosaïque D/C est constituée pour sa part de la chaîne légère de la toxine de type D et de la chaîne lourde de la toxine de type C (cf. figure 1). Le tableau 1 indique les différents sous-types identifiés. Pour éviter une inflation dans la désignation de sous-types, à partir de 2015, la communauté scientifique a proposé qu'un nouveau sous-type ne soit validé que si sa séquence en acides aminés différait de plus de 2,6 % de celle des autres sous-types du même type (Peck *et al.* 2017).

² L'espèce *C. argentinense* du groupe IV était initialement nommée *Clostridium botulinum*.

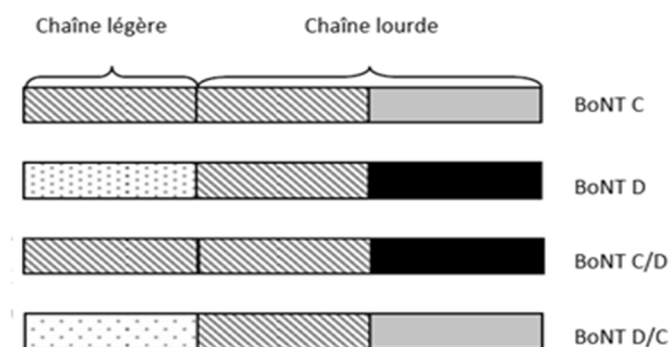


Figure 1 : Schéma de la structure des toxines botuliques C, D, C/D et D/C (Woudstra *et al.* 2012)

2.1.2 Caractéristiques microbiologiques

2.1.2.1 Aspects microscopiques, macroscopiques et métaboliques

Les *Clostridium botulinum* sont des bacilles droits de grande taille pouvant aller jusqu'à 20 µm de long et 0,6 µm de large. Les bactéries sont positives à la coloration de Gram. Les *Clostridium botulinum* sont mobiles avec une ciliature péritriche. Ils ont la capacité de sporuler, ce qui permet aux souches de résister lorsque les conditions environnementales sont défavorables à la forme végétative. La forme sporulée peut être résistante à certaines opérations comme le traitement thermique ou la désinfection.

L'aspect macroscopique des colonies sur milieu gélosé est très hétérogène et il n'est pas possible de dégager des caractéristiques générales, d'autant que leurs caractères morphologiques évoluent souvent au cours de la culture. Certaines souches, par ailleurs, ne se développent qu'en milieu liquide.

Le métabolisme des *Clostridium botulinum* est de type chimio-organotrophe fermentaire, les produits terminaux du métabolisme sont des acides, généralement de type acétique, butyrique et propionique.

Le rôle physiologique des toxines botuliques n'est pas connu et leur présence n'est pas indispensable à la survie et à la croissance des souches qui les produisent (DasGupta 2006).

2.1.2.2 Conditions et mécanismes de croissance, de sporulation et de toxinogénèse

■ Croissance

Les souches de *Clostridium botulinum* sont des anaérobies stricts, mais certaines souches peuvent néanmoins se développer lorsqu'un faible taux d'oxygène est présent. La viabilité des cellules végétatives diminue graduellement en présence d'oxygène, de manière variable selon les souches. Cependant les spores de *C. botulinum* peuvent survivre pendant de longues périodes à l'air et peuvent germer en présence d'oxygène (Lund et Peck 2013). Les autres conditions permettant la croissance, en particulier la température, varient en fonction des groupes de *Clostridium botulinum*. Le tableau 1 indique les températures de croissance pour les différents groupes de *Clostridium botulinum*. Ces températures de croissance sont assez similaires excepté pour le groupe II, dont la température optimale de croissance est plus basse de quelques degrés et dont les souches sont capables de se multiplier dans un environnement froid, *i.e.* à partir de 3 °C. La température de toxinogénèse est généralement similaire à celle de la croissance. Un pH inférieur à 5 inhibe généralement la croissance et la toxinogénèse. Une forte concentration en sel (au-dessus de 5 %) inhibe la croissance des *Clostridium botulinum* et la toxinogénèse.

■ Spore et sporulation

La formation de spores bactériennes est observée dans de nombreux environnements naturels ou anthropisés (Carlin 2011). La formation en zone humide des spores de *C. botulinum* de type C, D ou mosaïques ou E à partir des cadavres d'animaux en décomposition contribue probablement à leur survie et à leur dispersion (Espelund et Klaveness 2014). Les stades de développement et de dormance des bactéries sporulantes, incluant les clostridies, peuvent être représentés sous la forme d'un cycle biologique comprenant la germination d'une spore, sa multiplication sous forme de cellules végétatives dont certaines produisent à leur tour des spores (Dürre 2014). Lors du processus de sporulation, les cellules végétatives se différencient pour donner des (endo)spores. Ces spores possèdent des capacités de résistance à des agents physiques ou chimiques sans commune mesure avec celles des cellules végétatives dont elles sont issues. Les spores bactériennes peuvent rester en dormance et sans activité métabolique pendant de très longues périodes. La sporulation chez les *Clostridiaceae* est déclenchée par un appauvrissement du milieu environnant en nutriments et/ou un signal de densité cellulaire (*quorum sensing*). Le déclenchement du processus de sporulation lui-même, ainsi que son rendement (*i.e.* le nombre et la proportion de cellules végétatives qui formeront une spore) sont variables selon les groupes et les souches, et sont sous la dépendance de nombreux facteurs nutritionnels et environnementaux (Gauvry *et al.* 2017). La germination des spores est déclenchée par des *stimuli* de natures diverses. Cependant, dans les environnements naturels, les inducteurs de germination les plus probables sont généralement des molécules de petite taille de type acides aminés, nucléosides, sucres, dont l'action peut être amplifiée par des co-facteurs (lactate, cations Na⁺ ou K⁺, ou anions) (Setlow, Wang et Li 2017). La germination se traduit par une perte des propriétés de résistance de la spore et un retour à la vie végétative lorsque les conditions favorables à la multiplication des cellules (certaines sont rassemblées dans le tableau 1) sont présentes.

■ Toxinogénèse

Les toxines botuliques sont produites uniquement par les cellules végétatives. Les quelques travaux relatifs à la régulation de leur synthèse ne peuvent donner une vision exhaustive des facteurs modulant la synthèse des différents types de neurotoxine (Connan *et al.* 2013). Néanmoins, ils permettent d'établir que :

- même si des facteurs physiques (tels que la température) ou nutritionnels modulent la synthèse des toxines botuliques, celle-ci est possible pour tous les types de *C. botulinum* dans une très large variété de conditions environnementales et est favorisée par les mêmes conditions que celles favorisant la production des spores ;
- la synthèse des toxines botuliques se produit préférentiellement en fin de phase exponentielle – début de phase stationnaire de la courbe de croissance des cellules végétatives et décline pendant la phase stationnaire ;
- même si la co-régulation de la synthèse des toxines botuliques avec les mécanismes de sporulation varie selon les types de *C. botulinum*, les toxines sont produites, que le processus de multiplication aboutisse ou non à la sporulation.

Tableau 1 : Classification et caractéristiques physiologiques des *C. botulinum* et des espèces de *Clostridium* neurotoxigènes en conditions de laboratoire (adapté de Peng Chen et al. (2012), Lund et Peck (2013), Popoff (2017), Moore et Lacey (2019), Anses (2020b))

Groupe	Groupe I <i>C. botulinum</i> Protéolytique	Groupe II <i>C. botulinum</i> Non protéolytique	Groupe III <i>C. botulinum</i> Non protéolytique	Groupe IV <i>C. argentinense</i> Protéolytique	Groupe V <i>C. butyricum</i> Non protéolytique	Groupe VI <i>C. baratii</i> Non protéolytique
Type de toxines	A, B, F	B, E, F	C, D	G	E	F
Sous-types de toxines	A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B8, bivalent B (Ba, Bf, Ab), F1, F2, F3, F4, F5, F8, X	E1, E2, E3, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, B4 ou non protéolytique B, F6 ou non protéolytique F	C, C/D, D, D/C	G	E4, E5	F7
Support des gènes codant les toxines	Chromosome/plasmide	Chromosome/plasmide	Phage	Plasmide	Plasmide	Plasmide
Bactéries apparentées non toxigènes	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. taeniosporum</i>	<i>C. novyi</i> <i>C. haemolyticum</i>	<i>C. subterminale</i> <i>C. proteolyticus</i> <i>C. schimacherense</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. baratii</i>
Protéolyse	+	-	-	+	-	-
Saccharolyse	-	+	-	-	+	+
Croissance						
Température optimale (°C)	35-40	25-30	37-40	37	30 -37	30-45
Température minimale (°C)	10	2,5	15	/	12	10
pH minimum	4,6	5	5,1	4,6	4,8	3,7
a _w minimum	0,94	0,97	0,97	0,94	ND	ND
% NaCl inhibant la croissance	10	5	5	10	ND	8,5

Légende : « + » : présence ; « - » : absence ; ND : non déterminé

2.1.3 Caractéristiques des toxines botuliques

Les toxines botuliques constituent une famille de toxines protéiques qui ont une structure chimique et des propriétés toxicologiques similaires, mais qui se distinguent entre elles par leurs caractéristiques immunogéniques. Cette variabilité du pouvoir immunogène a été utilisée pour les classer en neuf types ou sérotypes (A à H et X). Au-delà de ces différences immunogéniques, les différents types de neurotoxines botuliques se distinguent aussi par des différences au niveau de :

- leur spécificité d'hôtes ;
- leurs cibles moléculaires ;
- leur toxicité.

En fonction des acides aminés touchés par les mutations, les sous-types de toxines peuvent présenter des caractéristiques distinctes au niveau de leur toxicité (p.ex. fixation sur les récepteurs, entrée dans les cellules cibles), de leur mode d'action (p. ex. activité enzymatique de la chaîne légère), de leurs propriétés physico-chimiques (p.ex. stabilité), de leur antigénicité (p.ex. neutralisation par des anticorps à finalité thérapeutique) (Mazuet *et al.* 2016).

2.1.3.1 Structure des toxines botuliques

Les toxines botuliques sont synthétisées simultanément avec d'autres protéines sous la forme de complexes protéiques: la protéine Non Toxique Non Hémagglutinante (NTNH) retrouvée chez tous les types et les hémagglutinines (Ha70 ; Ha 33 et Ha17) retrouvées chez les types A, B, C, D et G.

Quels que soient les types, les toxines botuliques sont synthétisées sous la forme d'une chaîne polypeptidique monocaténaire qui est transformée post-traductionnellement en une molécule double chaîne d'un poids moléculaire de l'ordre de 150 kDa. Chaque toxine est constituée d'une chaîne dite légère (LC) de 448 acides aminés, d'un poids moléculaire de l'ordre de 50 kDa et d'une chaîne dite lourde de 100 kDa (HC) de 832 acides aminés. Les deux chaînes sont reliées entre elles par un pont disulfure. La chaîne légère est une enzyme endopeptidase de type métalloprotéase zinc dépendante et porte l'activité biologique de la neurotoxine. La chaîne lourde assure la liaison aux récepteurs neuronaux (ganglioside et protéine vésiculaire).

2.1.3.2 Mécanisme d'action

Le mode d'action des toxines botuliques se décline en quatre étapes (cf. figure 2) : fixation sur les récepteurs localisés sur la terminaison du neurone cible, internalisation dans la terminaison nerveuse sous la forme d'un complexe BoNT/récepteur via une vésicule d'endocytose, translocation de la chaîne légère du compartiment vésiculaire vers le cytosol après rupture du pont disulfure et action protéolytique de la chaîne légère sur sa protéine cible du complexe SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment receptor*). Chaque chaîne légère clive une protéine cible du complexe SNARE qui intervient dans la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique. La perte d'activité des protéines du complexe SNARE provoque l'inhibition de la libération de l'acétylcholine (Tehran et Pirazzini 2018; Lindström et Korkeala 2006). La diminution de la quantité d'acétylcholine libérée se traduit par une baisse de la contraction musculaire et l'apparition d'une paralysie dite flasque. Selon son type, chaque neurotoxine a comme substrat une protéine spécifique du complexe SNARE et un site de clivage propre. La diversité des sites de clivage selon les types de toxines pourrait expliquer les différences observées en termes de nature, de délai d'apparition et de durée des signes cliniques.

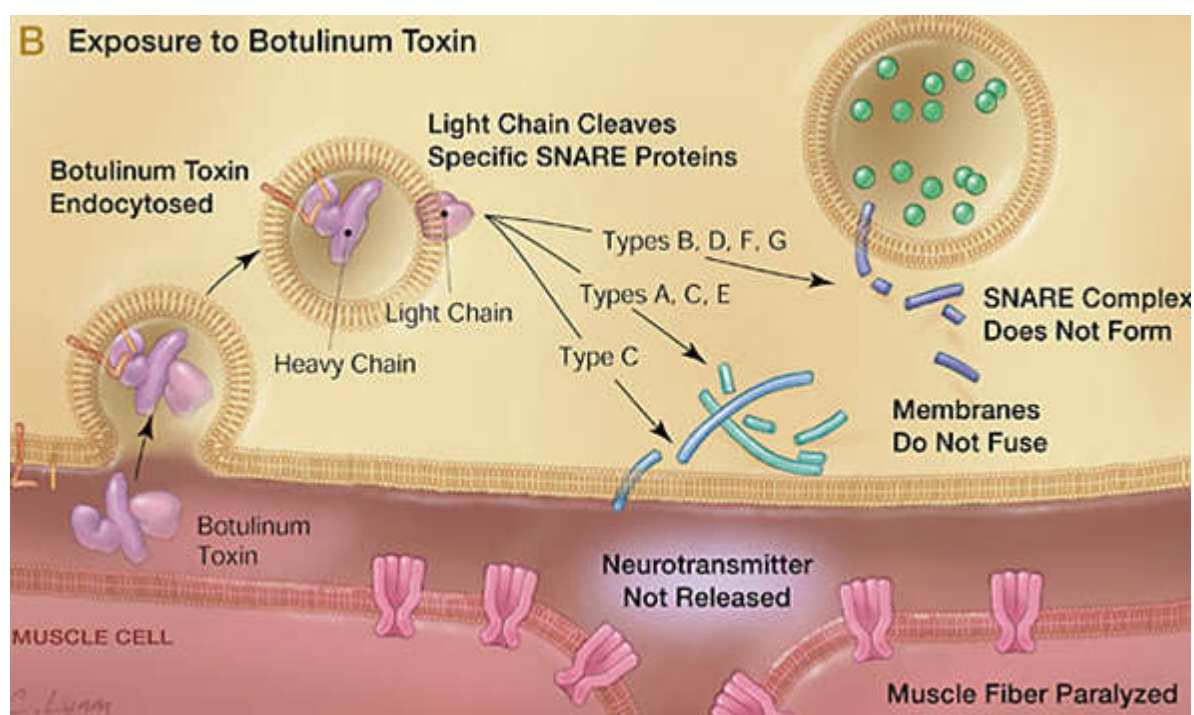


Figure 2 : Schéma du mode d'action des toxines botuliques dans les neurones (en jaune sur le schéma)
(Arnon et al. 2001)

2.1.3.3 Toxicité

Les toxines botuliques sont les agents causaux du botulisme, une maladie qui est retrouvée chez l'Homme sous cinq formes (cf. 2.2.1). Les toxines botuliques sont considérées comme les toxines les plus létales connues (Arnon *et al.* 2001). Le type A est considéré comme le plus létalet, et pour ce type, les doses létales chez l'Homme sont estimées à $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ par voie digestive, 10 à 15 ng.kg^{-1} par voie inhalée et 1 à 2 ng.kg^{-1} par voie parentérale. Les toxines botuliques n'ont pas d'effet par la voie cutanée car la peau saine assure une barrière efficace. Les toxines botuliques de type A, B, E et plus rarement F sont les types les plus fréquemment retrouvés dans le botulisme humain (Snow *et al.* 2021).

2.2 Maladie humaine

En France, le botulisme humain est une maladie à déclaration obligatoire. Dans ce cadre, toute suspicion de botulisme humain implique (article L3113-1 du code de la santé publique) sa déclaration à l'agence régionale de santé (ARS) et sa confirmation biologique par le Centre National de Référence (CNR) des bactéries anaérobies et du botulisme (Institut Pasteur de Paris).

2.2.1 Généralités, signes cliniques et aspects épidémiologiques

En matière de botulisme chez l'être humain, la suspicion clinique et le diagnostic présumé sont établis sur la base des signes cliniques et des informations épidémiologiques.

Le botulisme doit être suspecté chez un patient non fébrile, avec apparition aiguë de signes et symptômes d'une atteinte bilatérale des nerfs crâniens, suivie d'une paralysie flasque bilatérale descendante des muscles volontaires qui peut évoluer vers des troubles respiratoires critiques et même la mort.

Chez les nourrissons, le botulisme est suspecté s'il y a apparition aiguë d'une diminution de la succion, de l'apparition d'une ptose palpébrale³, d'inactivité et de constipation.

Les symptômes étant très caractéristiques, le diagnostic présomptif peut être établi sur la base des seules observations cliniques. La gravité des signes cliniques dépend de la quantité de toxine botulique absorbée et du type de toxine ; des formes frustes (troubles visuels et/ou troubles digestifs) peuvent survenir.

Cinq types de botulisme sont classiquement décrits, selon le mode de contamination et d'exposition à la toxine : botulisme alimentaire (intoxication), botulisme intestinal (toxi-infection), botulisme par blessure, botulisme iatrogène et botulisme par inhalation. Le botulisme alimentaire et le botulisme intestinal du nourrisson sont les deux formes les plus rencontrées chez l'Homme. Les signes cliniques associés aux différentes formes de botulisme, le diagnostic différentiel ainsi que le traitement sont présentés en détail dans le rapport socle (Anses 2021a). Ci-dessous, quelques aspects épidémiologiques sont présentés pour chaque type de botulisme incluant, au regard d'une des questions de la saisine, une mise en perspective dans un contexte professionnel d'abattage des bovins. Le botulisme iatrogène, lié à un surdosage de toxine lors d'un traitement médical ou cosmétique, n'est pas abordé. Il n'est pas concerné par la saisine et aucun cas n'a été décrit en France jusqu'à présent.

2.2.1.1 Botulisme alimentaire (intoxication)

Le botulisme alimentaire est la principale cause de botulisme humain. Il résulte d'une intoxication par voie digestive due à la présence de la toxine préformée dans un aliment. Celui-ci est décrit sur tous les continents et est d'incidence variable. En Europe, ce sont surtout des conserves et des produits de fabrication familiale ou artisanale qui sont concernés, essentiellement des salaisons, des charcuteries (le porc est souvent impliqué) ou encore des conserves de végétaux. Dans quelques cas, plus rares, des aliments du commerce ou des repas au restaurant ont été impliqués. Après ingestion, la toxine résiste à l'acidité gastrique et aux enzymes digestives et est absorbée principalement par le duodénum et le jéjunum. Elle passe ensuite dans la circulation sanguine. Les sérotypes A, B et E sont clairement associés au botulisme alimentaire.

Dans un contexte professionnel d'acquisition en filière bovine et particulièrement à l'abattoir, seule une exposition à de la toxine botulique provenant d'un animal en incubation pourrait survenir (cf. 2.3.5). La toxine pourrait se déposer sur les mains souillées d'un travailleur et être ingérée suite à un manque d'hygiène élémentaire.

2.2.1.2 Botulisme infantile (toxi-infection)

Cette toxi-infection survient lorsque des spores de *C. botulinum* sont ingérées. Ensuite, les spores germent, les bactéries se multiplient dans le tractus gastro-intestinal et libèrent la toxine produite *in situ*. Ce botulisme survient chez l'enfant âgé de six jours à 12 mois, mais surtout chez des nourrissons de deux à huit mois. Une faible dose de 10 à 100 spores de *C. botulinum* suffit à induire la colonisation intestinale et la production de toxine. Le microbiote intestinal qui, normalement, a un effet inhibiteur sur la croissance de *C. botulinum* dans le tractus digestif, pourrait ne pas être suffisamment développé ou ne pas jouer son rôle inhibiteur chez les nourrissons de moins d'un an (Popoff 2018).

2.2.1.3 Botulisme infectieux de l'adulte (colonisation intestinale) (toxi-infection)

Cette forme rare et mal comprise est similaire au botulisme infantile, mais survient chez un adulte. Il n'existe pas de critères clairs pour distinguer les symptômes de ces cas de toxi-infection des autres cas de botulisme chez l'adulte. Elle implique généralement les toxines de type A, mais les toxines de type B et F ont quelquefois été incriminées. Chez ces patients, des spores, bactéries et toxines sont

³ Déroulement plus ou moins important de la paupière supérieure et impotence totale ou partielle du muscle releveur, qui provoque un abaissement plus ou moins marqué du bord inférieur de la paupière.

retrouvées dans les selles et des spores peuvent aussi être retrouvées dans les restes d'aliments consommés, mais aucune toxine préformée n'y est retrouvée. Le microbiote intestinal, normalement bien établi et pleinement fonctionnel après la petite enfance, prévient la colonisation du tube digestif par la bactérie. Il est possible qu'un déséquilibre du microbiote (dépression immunitaire, utilisation prolongée d'antibiotiques ou chirurgie intestinale) soit en cause. Cette dysbiose est suggérée mais en raison du manque de connaissances sur le microbiote intestinal, les causes exactes de l'altération de ce dernier restent inconnues. Lorsque la toxine F a été impliquée, la maladie a été causée par *C. baratii* (Birch et Bleck 2019).

Les conditions médicales (citées précédemment) prédisposant à un botulisme infectieux de l'adulte sont reconnues suffisamment graves et incompatibles avec un travail à l'abattoir pour que l'exposition professionnelle causant un botulisme infectieux ne soit pas considérée dans ce rapport.

2.2.1.4 Botulisme par blessure (inoculation)

Le botulisme par blessure est une toxi-infection dont le mécanisme est identique à celui du tétanos. Les spores de *C. botulinum* peuvent contaminer les plaies. En situation d'anaérobiose, la bactérie peut s'y développer et y produire la toxine (majoritairement de type A ou B). Cette forme de botulisme, beaucoup plus rare que le tétanos (Popoff 2018), est, depuis les années 1980, presque exclusivement liée à l'utilisation de drogues injectables, en particulier l'héroïne. Auparavant, les cas de botulisme de plaie (Austin, communication personnelle) survenaient à la suite de fractures ouvertes, de plaies traumatiques profondes ou de plaies punctiformes contaminées par des corps étrangers. Il est essentiel que la blessure contaminée par *C. botulinum* soit suffisamment profonde pour créer des conditions d'anaérobiose permettant, après la germination de spores de *C. botulinum*, la production de toxine. Wapen et Gutmann (1974) rapportent un cas de botulisme consécutif à une blessure de type « abrasion/lacération » (selon les termes utilisés par les auteurs). Cependant, la blessure a nécessité un débridement des tissus dévitalisés, confirmant la présence d'une plaie profonde, ayant créé un milieu anaérobie (Wapen et Gutmann 1974). Aussi, dans presque tous les cas de botulisme par plaies survenus en Italie, les patients étaient des ouvriers de chantier ou des ouvriers agricoles victimes de blessures traumatiques (Anniballi, communication personnelle).

Dans le contexte du travail en abattoir, toute manipulation de couteau sera considérée comme une exposition professionnelle possible (exposition par inoculation à la suite d'une blessure ou d'une coupure avec un objet possiblement contaminé par des spores, des cellules végétatives ou des toxines). Cependant, même s'ils confirment la possibilité théorique de botulisme par blessure chez des travailleurs, plusieurs auteurs (Austin, Chatham-Stephens, Jacobs Slifka, De Rosa, communications personnelles) n'ont, à leur connaissance, jamais vu par expérience ou dans la littérature scientifique de cas spécifiquement liés à des activités de travailleurs en abattoir.

2.2.1.5 Botulisme d'inhalation

Le botulisme par inhalation est très rare (Popoff 2018; Rao et Maslanka 2018). Quelques cas ont été signalés chez des employés de laboratoire (Holzer 1962), qui manipulaient une grande quantité de toxines, et chez quelques personnes, à la suite de l'utilisation intranasale de cocaïne contaminée (MacDonald *et al.* 1985; Kudrow *et al.* 1988), dont des cas en France au début des années 2000 (type B) (F. Roblot *et al.* 2006). La présence d'une sinusite à *C. botulinum* ou une absorption directe à travers une muqueuse nasale ont été suggérées comme hypothèses étiologiques.

Les conditions de travail et la nécessité que des toxines soient présentes en grande quantité au niveau des muqueuses nasales des travailleurs en abattoir rendent très improbables un botulisme par inhalation. L'inhalation seule de spores, par un travailleur exposé en abattoir, ne causera pas de botulisme car au niveau des voies respiratoires supérieures et inférieures les conditions d'anaérobiose nécessaires à la germination des spores et à la production de toxine ne sont pas présentes. En effet, tenant compte de la présence ubiquitaire de spores de *C. botulinum* dans l'environnement, elles sont

sûrement souvent inhalées mais aucun cas de botulisme par inhalation n'est rapporté dans la population générale ni chez les travailleurs d'abattoir. À la suite d'inhalation de spores, il peut y avoir remontée mucociliaire de spores qui peuvent être ensuite dégluties. Seuls le botulisme infantile et le botulisme infectieux de l'adulte pourraient être causés par ce mécanisme.

2.2.1.6 Évolution clinique

Le traitement est au début symptomatique (prévention d'une insuffisance respiratoire) et peut être complété le plus rapidement possible, par l'administration d'une antitoxine heptavalente (Pegram et Stone 2020; Rao et Maslanka 2018).

La majorité des patients, rapidement diagnostiqués et pris en charge, guérissent sans séquelle. Cependant, selon la gravité de l'atteinte, la guérison peut survenir après plusieurs mois. L'amélioration clinique est liée à l'apparition de nouvelles terminaisons nerveuses, c'est pourquoi la rémission complète peut ne survenir qu'un an après l'apparition des signes et symptômes.

Les patients ayant eu besoin d'une ventilation mécanique sont sevrés en moyenne après 58 jours (toxine de type A) et 26 jours (toxine de type B) (Hughes *et al.* 1981).

Actuellement, avec un diagnostic et des soins de support rapides, le taux de mortalité du botulisme est faible, moins de 1 % pour le botulisme infantile et moins de 10 % pour les autres formes (Pegram et Stone 2020).

2.2.2 Données de surveillance humaine

Préalablement à l'analyse des données de surveillance, le GT souligne la différence de définition existant en santé humaine et en santé animale entre les termes « cas » et « foyer » de botulisme.

En santé humaine, le « cas de botulisme » désigne un seul individu, tandis que le « foyer de botulisme » désigne un ou plusieurs individus.

En santé animale, les termes « cas » et « foyers » désignent deux populations animales différentes, quel que soit le nombre d'animaux concernés : le terme « cas » est uniquement utilisé pour des infections en faune sauvage (et peut concerner un ou plusieurs animaux) alors que le terme « foyer » est utilisé pour des infections chez les espèces domestiques.

2.2.2.1 Surveillance des cas de botulisme humain en France

Ce bilan présente la situation du botulisme humain en France à partir des données épidémiologiques de Santé publique France et des investigations biologiques du CNR.

Le nombre annuel de cas et de foyers reste stable pour la période de 2008 à 2018. Au cours de ces dix années, trois à 13 foyers (incidence annuelle moyenne de 7,5 foyers/an) et quatre à 25 cas (incidence annuelle moyenne de 14,5 cas/an) de botulisme humain d'origine alimentaire sont observés annuellement en France. L'incidence du botulisme est probablement sous-estimée du fait de formes cliniques frustes, comme celles se limitant à des troubles visuels passagers et qui ne font pas l'objet d'examens complémentaires (Mazuet *et al.* 2018; P. Roblot *et al.* 1994).

Parmi les 100 foyers de botulisme humain recensés sur la période 2008-2018, 82 foyers (89,8 % des cas) étaient d'origine alimentaire, 17 (9,6 % des cas) foyers correspondaient à du botulisme infantile et 1 foyer (0,6 % des cas) à du botulisme par blessure, observé en 2008 à la suite d'une fracture ouverte de la jambe chez un accidenté de la route. Le botulisme par inhalation est extrêmement rare en France : un unique foyer (deux cas) a été rapporté sur la période 1987-2019 par inhalation de cocaïne.

- Foyers de botulisme d'origine alimentaire

Entre 2008 et 2018, 82 foyers de botulisme humain d'origine alimentaire ont été recensés en France. Ils représentent un total de 159 cas (impliquant entre un et six personnes par foyer). Le type B est responsable de 53 foyers (et 106 cas) soit 64 % des foyers et 67 % des cas, le type A de 15 foyers (et 30 cas) soit 18 % des foyers et 19 % des cas. Les types E (deux foyers) et F (deux foyers) sont à l'origine de quatre et cinq cas respectivement. Enfin, pour 10 foyers (14 cas) il n'a pas été possible de déterminer le type toxinique à l'origine des foyers ou des cas (prélèvements biologiques absents, insuffisants ou trop tardifs, aliment non identifié ou indisponible). Faute de restes alimentaires disponibles pour analyse, l'aliment responsable n'a pu être identifié que dans 41 foyers (soit 50 %).

La figure 3 présente les caractéristiques des foyers de botulisme humain sur la période 2008-2018 pour lesquels la source alimentaire a été identifiée. Parmi les 41 foyers, 28 foyers ont pour origine des préparations familiales et 13 des préparations commerciales (King 2008) et/ou artisanales (Pigeon *et al.* 2011). Les deux sources principales d'aliment sont le jambon cru (17 foyers) ainsi que les conserves de légumes (12 foyers). D'autres produits de charcuterie sont impliqués (7 foyers). Enfin, trois aliments composites, un poisson fumé et salé (King *et al.* 2009) et de la viande hachée ont également été à l'origine de foyers de botulisme. Les types A et B restent largement majoritaires et aucun foyer/cas de botulisme humain de type C, D ou mosaïque C/D ou D/C n'a été recensé en France durant cette période.

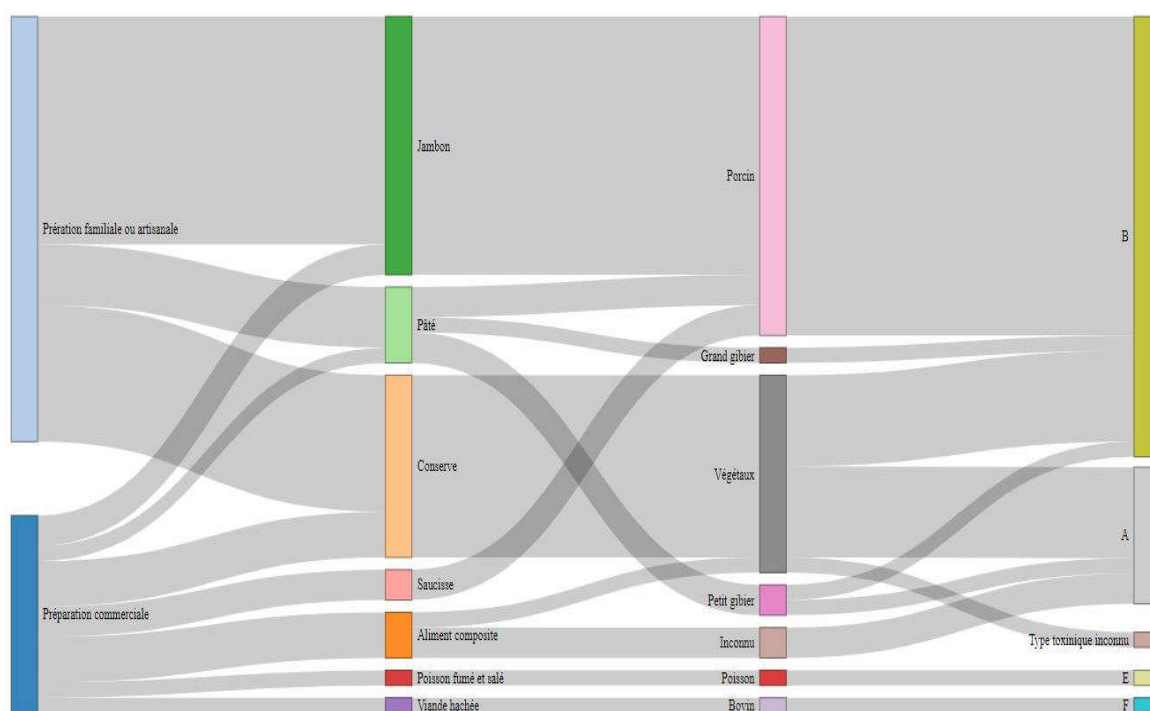


Figure 3 : Répartition des foyers de botulisme alimentaire avec identification de la source alimentaire (n = 41) en France entre 2008 et 2018 en fonction du type de préparation, de la nature de l'aliment, de l'origine des aliments et du type de toxine botulique.

D'après (Mazuet *et al.* 2011; Mazuet *et al.* 2018; Mazuet *et al.* 2014)

■ Cas de botulisme infantile en France

Le premier cas de botulisme infantile a été identifié en France en 2004 (King *et al.* 2010). Au cours de la période 2004-2018, 19 cas de botulisme par colonisation intestinale ont été signalés chez des enfants (17 âgés de moins de 12 mois et deux cas à l'âge de 12 et 18 mois). Neuf étaient atteints de botulisme de type A et dix de type B. Tous les échantillons d'aliments éventuellement impliqués ont fourni un résultat négatif (y compris les six échantillons de miel). Une contamination environnementale a été

suspectée dans deux cas (Bernardor *et al.* 2018). En conclusion, l'origine des cas de botulisme infantile en France sur la période 2004-2018 reste inexplicée.

2.2.2.2 Situation dans d'autres pays

L'analyse des données de surveillance du botulisme humain dans le monde sur la période 1976-2018 réalisée par le GT socle indique que :

- la forme de botulisme la plus fréquente est le botulisme alimentaire (ingestion de toxine préformée). Le botulisme infantile est majoritaire parmi les autres formes de botulisme ;
- les types de toxines botuliques à l'origine des cas humains sont les types A et B puis E, occasionnellement F.

2.2.2.3 Foyers de botulisme alimentaire associés aux produits carnés et laitiers bovins

Les produits carnés d'origine bovine ont rarement été identifiés comme source de botulisme. En France, seuls deux foyers ont été identifiés : saucisse de bœuf et de volailles (type B – 4 cas) en 2003 (Espié *et al.* 2003) et viande hachée en sauce (*C. baratii* type F – 3 cas) en 2015 (Mazuet *et al.* 2017) ;

S'agissant des produits laitiers, une revue de Lindström *et al.* (2010) ne rapporte que 20 foyers documentés de cas humains associés (de façon plus ou moins convaincante et directe) à des produits laitiers sur une période couvrant près d'un siècle (entre 1912 et 2007) dans le monde dont un en France en 1973. Les types incriminés sont A et B, aucune toxine de type C, D ou mosaïques n'est mentionnée.

Pour l'ensemble de ces foyers, les facteurs contribuant à la toxigenèse étaient un défaut de procédé (e.g. traitement thermique insuffisant, fermentation non maîtrisée), une rupture de la chaîne du froid ou des mauvaises conditions de conservation du produit (température et durée).

2.2.2.4 Cas de botulisme liés à une exposition professionnelle en abattoir

Une demande a été faite par le GT auprès des autorités de santé de plusieurs pays, concernant l'existence de cas de botulisme de plaie ou par inhalation chez des travailleurs en abattoir. Aucun des 19 pays⁴ qui ont répondu n'avait recensé de tels cas.

2.2.3 **Évaluation du caractère zoonotique des *Clostridium botulinum* du groupe III (types C, D, et mosaïques)**

Le caractère zoonotique des *Clostridium* du groupe III (objet de la présente saisine) a été évalué sur la base de l'examen des données épidémiologiques internationales (cas de botulisme humain liés à ces toxines dans un contexte de transmission par des denrées alimentaires d'origine animale) et des résultats d'essais *in vitro* et *in vivo* sur l'effet des toxines sur l'être humain.

2.2.3.1 Analyse des publications sur les cas humains

Dans la littérature scientifique, neuf publications ont pu être identifiées sur la base d'une revue récente (Rasetti-Escargueil, Lemichez et Popoff 2019). Elles ont été analysées, puis classées en foyers de botulisme alimentaire suspectés ou confirmés selon les critères de définition de cas actuellement utilisés par le CNR et Santé publique France (Anses 2021a). Deux publications portant sur des cas survenus

⁴ Pays ayant répondu : Allemagne, Angleterre, Argentine, Autriche, Belgique, Bulgarie, Danemark, Écosse, États-Unis, Finlande, Estonie, Irlande, Italie, Lettonie, Luxembourg, Monaco, Pologne, Suède, Suisse.

chez des primates ont également été examinées. Une publication récente (Semenko *et al.* 2020) fait mention de foyers suspectés de botulisme alimentaire de type C, mais elle n'a pas fait l'objet d'une analyse par le GT du fait de l'absence de précisions sur la définition des cas.

L'analyse critique des publications sur les cas humains réalisée par le GT socle a conduit à identifier, au niveau international, entre 1950 et 2006 (Anses 2021a) :

- deux foyers de botulisme de type C confirmés (un alimentaire et un infantile, cinq cas au total dont un décès ; France, Japon) ;
- quatre suspicions cliniques de botulisme de type C (sept cas dont deux décès ; USA, ex-URSS, France) ;
- un foyer de botulisme de type D suspecté (deux cas ; Tchad) ;
- six foyers sans confirmation du type (B ou C) (14 cas dont quatre décès ; ex-Rhodésie, Sénégal, France).

Par ailleurs, deux foyers de botulisme alimentaire de type C ont été décrits chez des primates en captivité. En ce qui concerne les sources de contamination, celles-ci n'ont pas été confirmées et une incertitude persiste quant à l'origine zoonotique des cas rapportés.

■ Incertitudes

Les principales incertitudes identifiées au cours de cette analyse sont liées à la méthode de diagnostic. Avant 1970, le diagnostic de botulisme humain est essentiellement confirmé biologiquement par la mise en évidence d'une toxine préformée présente dans l'aliment suspect. Le diagnostic sur sérum du malade n'était pas réalisé en France avant 1970. L'hypothèse que des cas de botulisme C ou D aient ainsi pu échapper au diagnostic peut donc être raisonnablement émise.

La mise à disposition de méthodes performantes de typage des toxines sériques et de criblage des gènes chez *C. botulinum* est plus récente. Mais, elle correspond à une période où l'incidence du botulisme est plus faible. L'existence de telles méthodes à une période où l'incidence était plus élevée aurait peut-être permis de révéler d'éventuels cas de botulisme D et de documenter l'origine zoonotique de plus nombreux cas de botulisme alimentaire de type C.

De manière générale, une certaine hétérogénéité quant aux méthodes de typage mises en œuvre en ce qui concerne plusieurs paramètres peut être constatée dans les différentes études disponibles. Le poids recommandé des souris, le volume injecté, le titrage de la toxine avant la séroneutralisation, les temps d'incubation, le titre des sérums anti-toxines varient selon les laboratoires et les études publiées, ce qui constitue également une source d'incertitude.

2.2.3.2 Effet des toxines botuliques de type C et D sur l'être humain

Deux types d'essais ont été réalisés pour connaître l'action des toxines botuliques de type C et D sur l'être humain :

- des essais *in vitro* sur des cultures de cellules nerveuses ou sur des muscles squelettiques isolés ;
- des essais *in vivo* par injection dans des muscles squelettiques chez des volontaires.

L'effet *in vitro* sur préparation de muscle humain isolé est mesuré par la diminution de paramètres électrophysiologiques. L'effet sur un muscle de la paroi abdominale de la toxine de type C (10^{-8} M) est voisin de celui de la toxine de type A prise comme référence alors que la toxine de type D n'a aucun effet, même aux fortes doses (Coffield *et al.* 1997). Cependant, un effet de la toxine de type D peut être décrit sur d'autres préparations musculaires (muscle intercostal) (Anderson *et al.* 2009). L'examen de l'effet de la toxine de type D sur les cultures de cellules nerveuses (2 systèmes humains et 3 systèmes murins - rat et souris) d'explants primaires montre des différences importantes d'activité

comparativement à la toxine de type A (Pellett *et al.* 2015). Une concentration efficace médiane (EC₅₀) de 50 UI est obtenue. Cette valeur d'efficacité est 150 fois inférieure à celle obtenue avec la toxine de type A1 (Pellett *et al.* 2015). Ces différences suggèrent des modes de pénétration dans les cellules cibles et des mécanismes d'action différents entre la toxine de type D et les toxines de type A ou E (Pellett *et al.* 2015).

Les essais *in vivo* chez l'être humain ont été réalisés soit sur des volontaires soit sur des patients.

L'effet des toxines de type C ou D a été comparé à celui de la toxine de type A sur les muscles des extenseurs de doigts de pieds de volontaires (Eleopra *et al.* 1997). L'effet de la toxine de type C est très voisin de celui obtenu avec la toxine de type A. Ce test sur 15 volontaires a été suivi par un test thérapeutique sur trois patients avec des résultats rapides et prolongés (12 semaines) (Eleopra *et al.* 1997). Au contraire, l'effet de la toxine de type D est nul à faible dose (3 UI) et très modéré à forte dose (10 UI) comparé aux effets du même type toxinique sur rat ou sur souris (Eleopra *et al.* 2013). Néanmoins, la toxine de type D a un effet inhibiteur sur les synapses cholinergiques autonomes. Cet effet est démontré par un test de sueur⁵ sur quatre volontaires. L'effet est proportionnel aux doses administrées pour les deux toxines A et D, mais inférieur de moitié pour la toxine de type D comparé à celui obtenu avec la toxine de type A (Dressler *et al.* 2019).

En conclusion

L'analyse critique des publications sur les cas humains a conduit à identifier entre 1950 et 2006 au niveau mondial : deux foyers de botulisme de type C confirmés (cinq cas dont un décès ; France, Japon) et 11 foyers suspects (C, D ou indéterminé).

Les essais *in vitro* et *in vivo* réalisés pour évaluer les effets des toxines C et D montrent que :

- la toxine C présente un effet similaire à celui de la toxine A ;
- l'effet de la toxine de type D est nul à faible dose et très modéré à forte dose.

Les données épidémiologiques disponibles permettent d'établir une relation causale entre l'exposition à la toxine botulique et/ou *Clostridium botulinum* de type C et la survenue de cas de botulisme alimentaire humain (deux foyers confirmés). Néanmoins, les sources de contamination n'ont pas été formellement confirmées et une incertitude faible demeure sur l'origine zoonotique de ces cas.

S'agissant du type D, un seul foyer de botulisme alimentaire a été identifié dans le monde sur la période étudiée, pour lequel l'exposition alimentaire à la toxine botulique de type D n'a été que suspectée.

Les cas de botulisme humain de types C et D sont donc rarissimes comparativement à ceux de types A, B, E et F. Plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer la quasi absence de cas liés aux types C, D, C/D, D/C : faible sensibilité de l'hôte, faible exposition humaine, défaut de surveillance.

- La faible sensibilité de l'hôte aux toxines est l'hypothèse privilégiée. Plus précisément, les essais *in vivo* réalisés par injection intradermique montrant l'efficacité de la toxine (particulièrement de type C), la faible sensibilité correspondrait à une faible absorption intestinale des toxines. Par ailleurs, les résultats d'essais sur la toxine de type D suggèrent des modes d'action différents de ceux de la toxine de type A.
- L'hypothèse d'une faible exposition aux types C et D est difficile à justifier d'après les données disponibles aux niveaux des élevages d'animaux de production. Ces données montrent la présence des spores dans les réservoirs. L'exposition aux spores de type C et D est donc possible et la question de sa fréquence se pose également pour le botulisme infantile. En revanche, les données relatives à l'écophysiologie des types C et D montrent qu'il est plus facile de contrôler la croissance et la toxinogénèse de ces types toxiques dans les aliments au moins par rapport aux types A et B (cf. section 2.4.1).
- La sensibilité du système de surveillance ne semble pas être en cause. Les méthodes de diagnostic permettent de détecter l'ensemble des toxines. Toutefois, la faible toxicité des types

⁵ Test de l'effet de la toxine injectée par voie intradermique sur la sécrétion de sueur

C et D pourrait être à l'origine de formes frustes qui ne seraient pas détectées par les systèmes de surveillance.

2.3 Maladie animale

2.3.1 Aspects réglementaires

Pour les animaux, *Clostridium botulinum* est classé comme danger sanitaire de 1^{re} catégorie (article L201-1 du Code rural et de la pêche maritime) chez « toutes les espèces sensibles ». Toute suspicion implique un signalement à la direction départementale en charge de la protection des populations (DDPP) et sa confirmation biologique par le Laboratoire National de Référence (LNR) (Anses / Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort - site de Ploufragan) et/ou le CNR. En revanche, en l'absence d'arrêté ministériel les imposant (aucune mesure de gestion n'a été définie à l'échelon national), les mesures appliquées dans les élevages suspects ou reconnus atteints restent, au titre de l'article L 223-1 du Code rural et de la pêche maritime, de la prérogative du préfet qui, en fonction de la situation locale et sur la base de conseils fournis par la DGAL, les prescrit par arrêté préfectoral de surveillance (APMS) et/ou d'infection (APDI). Le statut du botulisme en tant que maladie réglementée devrait cependant être prochainement modifié du fait de l'obligation de mise en conformité de la réglementation française avec le Règlement (UE) 2016/429 du Parlement Européen et du Conseil du 9 mars 2016, dit « Loi de santé animale » (LSA). La LSA a, en effet, désigné et réparti en cinq catégories (A à E) une liste des maladies transmissibles aux animaux ou aux êtres humains devant être soumise dans chaque État-membre, selon leur niveau de catégorisation, aux mesures de prévention et de lutte fixées. Cependant, le botulisme ne figure pas dans cette liste. L'entrée en vigueur de la LSA étant prévue en 2021, une nouvelle liste de maladies réglementées (remplaçant l'actuelle liste des dangers sanitaires) est attendue en France, de laquelle le botulisme, non catégorisé au titre de la LSA, devrait être exclu. Il est probable néanmoins, qu'une liste complémentaire de maladies réglementées puisse être constituée en France (maladies d'intérêt national), dans laquelle le botulisme pourrait être introduit, à charge pour l'État de fixer les mesures de gestion applicables à l'échelon national.

2.3.2 Données de surveillance relatives au botulisme bovin en France

Les cas de botulisme sont actuellement confirmés par deux laboratoires, le CNR et le LNR. Historiquement, c'est le CNR qui établissait les diagnostics de botulisme, à la fois chez l'être humain et les animaux. En 2012, un LNR a été créé au laboratoire de l'Anses de Ploufragan dans l'unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins (HQPAP), associant l'unité Épidémiologie Santé et Bien-être (EPISABE) ainsi que la Plateforme IdentityPath du Laboratoire de Sécurité des Aliments de l'Anses Maisons-Alfort. Depuis cette date, une partie des diagnostics animaux y sont effectués, sur les volailles dans un premier temps puis les oiseaux sauvages. En 2017, le LNR a commencé à diagnostiquer également des foyers chez les bovins.

Des données complémentaires ont été identifiées auprès d'autres partenaires : il est probable que le botulisme chez les bovins ne fasse pas toujours l'objet d'une demande d'analyse de confirmation auprès du laboratoire de référence. Des informations complémentaires sur les suspicions (données issues des demandes d'indemnisation des mortalités pour botulisme) sont probablement disponibles auprès des Groupements de défense sanitaire (GDS) mais elles n'ont pas été recherchées dans le cadre de cette saisine.

L'analyse présentée ici porte sur la période 2009-2019 à partir des données disponibles sur les cas confirmés provenant à la fois du CNR (de 2009 à 2019) et du LNR (de 2013 à 2019). Le nombre de foyers de botulisme bovin est disponible à partir de 2009 pour le CNR et 2017 pour le LNR. Une analyse

complémentaire a pu être conduite à partir des données du LNR permettant de décrire plus finement les caractéristiques de la maladie, notamment sa géolocalisation, et son évolution dans les élevages depuis 2013.

2.3.2.1 Répartition des foyers de botulisme par espèce

Sur la période 2009-2019, 592 foyers de botulisme animal ont été recensés dont 120 concernant les bovins, soit 20,3 %.

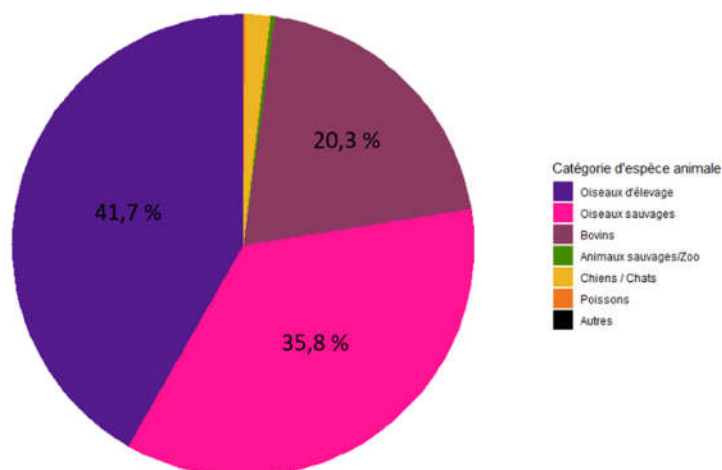


Figure 4 : Répartition des foyers botuliques recensés de 2009 à 2019 par catégorie d'espèce (n = 592)
(Source CNR/LNR)

Chaque année, une dizaine de foyers sont recensés dans l'espèce bovine. Ce nombre fluctue néanmoins selon les années et semble, pour les bovins, en augmentation à partir de 2015 (cf. figure 5) parallèlement à une optimisation méthodologique de l'échantillonnage/détection. Cette tendance à l'augmentation semble se confirmer : le LNR et le CNR ayant confirmé 22 épisodes en élevages bovins en 2020.

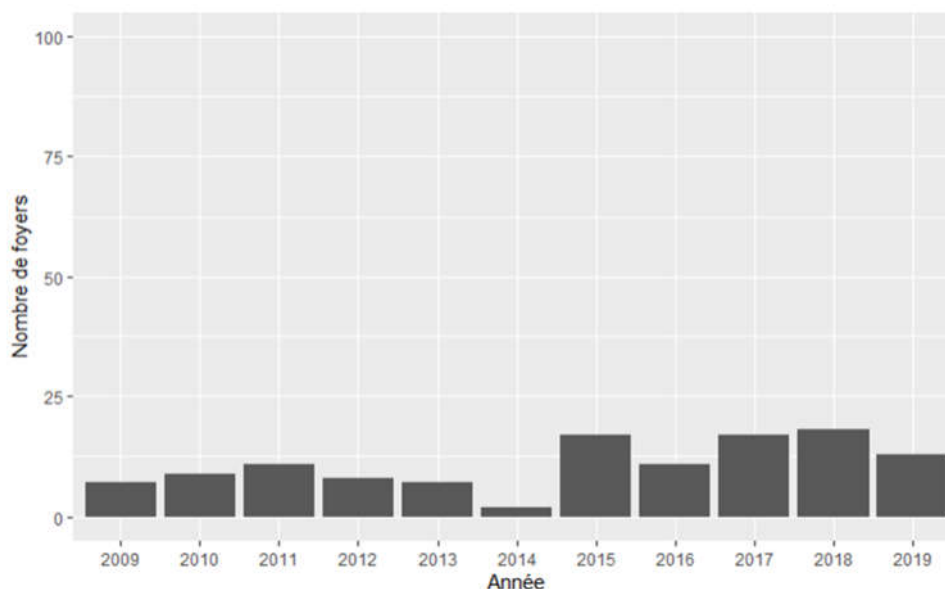


Figure 5 : Évolution du nombre de foyers de botulisme pour les bovins recensés de 2009 à 2019 (n = 120)
(Source CNR/LNR)

2.3.2.2 Répartition des types de *C. botulinum*

Le type mosaïque D/C représente la forme dominante chez les bovins (n = 82 foyers) suivie de la forme C (n = 12 foyers) (figure 6), contrairement aux oiseaux pour lesquels la forme mosaïque C/D domine. Avant 2010, le diagnostic biologique se faisait très majoritairement sur sérum par la méthode de séroneutralisation qui ne permettait pas de faire la distinction des formes mosaïques. Depuis cette date et la mise en œuvre de techniques PCR, les formes mosaïques sont devenues les formes majoritaires, aussi bien chez les oiseaux que chez les bovins.

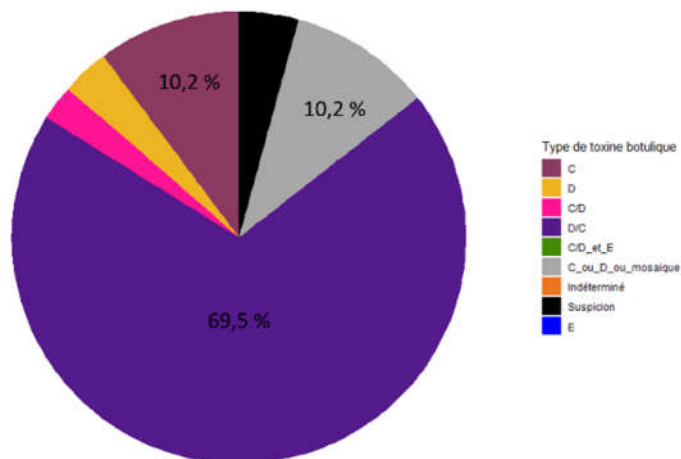


Figure 6 : Répartition des types de botulisme pour les foyers de bovins recensés de 2010 à 2019 (n = 118)
(Source CNR/LNR)

À partir des données du LNR, plus détaillées et exhaustives, obtenues sur 36 foyers, une analyse plus fine a pu être réalisée sur la période 2017-2019 permettant d'aborder d'autres indicateurs. Cette analyse est présentée ci-dessous.

2.3.2.3 Répartition géographique

La majorité des foyers en élevages de bovins se développent dans le grand ouest de la France, notamment en Bretagne, région de forte production (56 % des foyers bovins), mais des cas groupés ont pu être observés dans d'autres régions (cf. Figure 7). Une augmentation du nombre de foyers confirmés de botulisme bovin a été observée sur la période mai-juillet 2020 dans des élevages situés dans les régions de Bretagne, Pays de la Loire et Poitou-Charentes, avec un total de 12 foyers (type D/C) confirmés sur une période de dix semaines (Le Maréchal *et al.* 2020).

Même si la Bretagne semble être la région la plus concernée par les cas de botulisme tant bovin qu'aviaire, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre les pics de survenue dans ces deux filières.

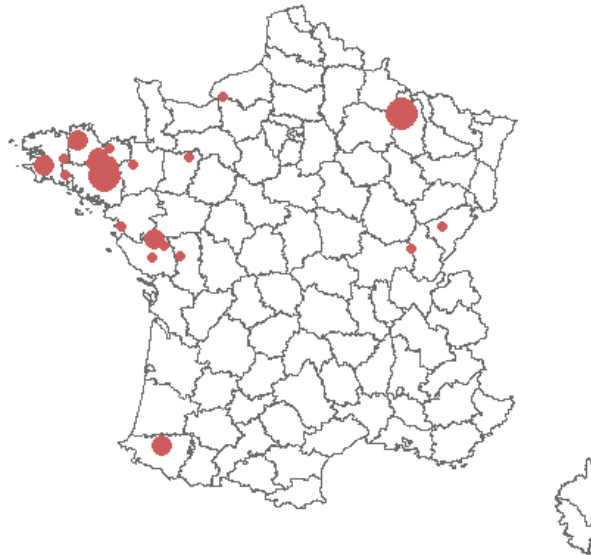


Figure 7 : Répartition des foyers de botulisme bovin recensés de 2017 à 2019 (n = 36)
(Source LNR) Les cercles représentent de 1 à 3 foyers selon leur surface.

2.3.2.4 Autres paramètres étudiés

D'autres paramètres ont été investigués (mortalité, âge de survenue de la maladie et type de production notamment) mais le nombre de données et/ou leur fiabilité sont insuffisants pour conclure. Sur la base des foyers confirmés, aucun effet saisonnier n'a pu être mis en évidence sur la survenue de cas chez les bovins, contrairement à ce qui a pu être observé chez les oiseaux.

2.3.2.5 Situation dans les autres pays européens

Les données de surveillance récoltées dans le cadre du projet européen ANIBOTNET par six autres pays (Italie, Belgique, Pologne, Pays-Bas, Irlande et Espagne) et sur la période 2016 à 2020 montrent les mêmes tendances.

Au cours de cette période, 114 foyers de botulisme ont été recensés dans ces six pays, ce qui est faible en comparaison des 208 foyers recensés en France. Les raisons de cette disparité, qui peuvent dépendre de multiples facteurs (incidence réelle, pression de surveillance, nombre et types d'élevages, espèces animales surveillées, etc.) n'ont pas été explorées. Les espèces les plus représentées sont les bovins, les volailles et les oiseaux sauvages (cf. Figure 8). Cependant, des différences de répartition entre espèces sont observées selon les pays. Chez les bovins la toxine majoritaire mise en évidence reste le type D/C dans cette investigation en Europe.

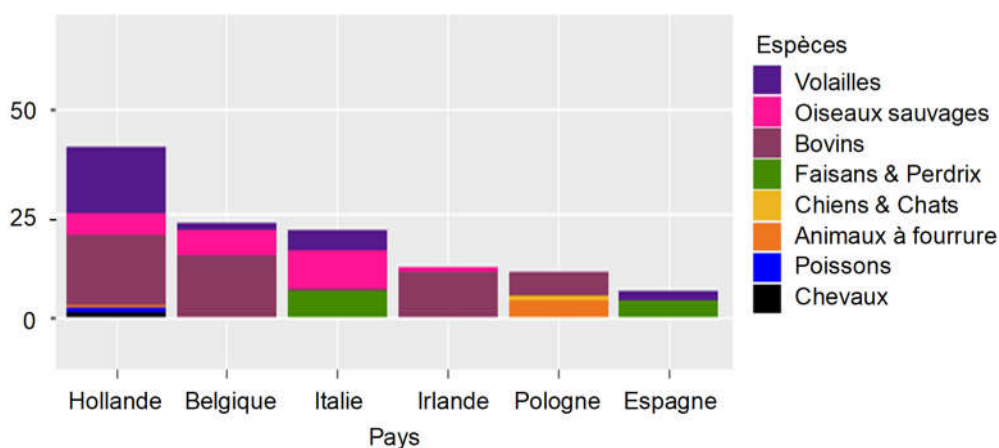


Figure 8 : Répartition des foyers de botulisme par espèce et par pays (n = 114)
(source ANIBOTNET)

2.3.2.6 Incertitudes et conclusion

Les cas présentés dans ce rapport correspondent aux foyers recensés par le CNR et le LNR. Le botulisme animal étant une maladie à déclaration obligatoire en France, l'ensemble des prélèvements collectés devraient donc transiter par les laboratoires de référence dès la suspicion. Toutefois, il est probable qu'un certain nombre de foyers ne soient pas repérés ou déclarés, sans toutefois pouvoir évaluer l'ampleur du phénomène. Cependant, cette sous-estimation est certainement limitée en filière bovine dans la mesure où les éleveurs doivent fournir une confirmation d'infection pour accéder au fonds d'indemnisation en cas de foyer.

Les caractéristiques des tests ont aussi évolué. L'optimisation des méthodes de prélèvements (choix des matrices, protocole d'échantillonnage, modalités de transport et de conservation) a probablement conduit à une meilleure sensibilité de détection. La sensibilité de la méthode de diagnostic au sens large s'est donc considérablement améliorée et permet aujourd'hui une meilleure confirmation des cas. Il reste néanmoins des situations de suspicions cliniques fortement évocatrices de la maladie, notamment en filière bovine, ne pouvant être confirmées par le laboratoire en fonction des caractéristiques du prélèvement reçu.

Les types de *C. botulinum* retrouvés dans les foyers de botulisme bovin sont différents de ceux identifiés dans les foyers humains ces dix dernières années en France et aucun foyer de botulisme humain investigué par Santé publique France et le CNR n'a été rattaché à un foyer de botulisme animal durant cette période.

2.3.3 Cycle épidémiologique en élevage bovin

C. botulinum au sens large est une bactérie présente, à la fois, dans le tractus digestif des animaux et dans l'environnement (sol, eau, sédiments, etc.). Ce caractère rend donc ses voies d'entrée multiples et diverses dans un élevage de bovins (cf. Figure 9). L'exhaustivité de leur identification n'est atteignable qu'au cas par cas, le GT socle a réalisé un exercice de hiérarchisation des principales sources ou véhicules de *C. botulinum* dans un cadre générique d'élevage bovin. Les sources ou véhicules présentés ici ne sont donc pas exhaustifs. Il est important de garder à l'esprit l'existence de possibles spécificités de contamination liées à la typologie propre de l'élevage concerné.

Les signes cliniques observés chez les bovins sont dus à l'ingestion de toxines botuliques et/ou de la bactérie (forme végétative ou spore) par les animaux *via* l'eau d'abreuvement (Doutre 1969) ou les aliments (pâtures (Popoff 1989), fourrages (Bano *et al.* 2015), aliments fabriqués à la ferme (Le Maréchal, Hulin, *et al.* 2019), ensilage (Guizelini *et al.* 2019; Myllykoski *et al.* 2009) ou enrubbage

(Relun *et al.* 2017) contaminés préalablement par *C. botulinum*. Sur la base d'une analyse critique (selon un format causes/effets), deux sources majoritaires de contamination à l'origine des foyers de botulisme bovin sont identifiées : le fumier de volailles, les volailles pouvant être porteuses asymptomatiques de la bactérie (Souillard *et al.* 2017) et les cadavres d'animaux commensaux (domestiques et sauvages) qui constituent un substrat de développement de *C. botulinum* favorable à la production de la toxine botulique (Le Maréchal, Hulin, *et al.* 2019). La contamination des aliments ou de l'eau par ces deux sources peut se faire directement (présence du cadavre ou du fumier dans l'eau ou l'aliment), mais également de manière indirecte via le matériel souillé (godet de tracteur par exemple), via la tenue du personnel (éleveur, technicien, vétérinaire (Souillard *et al.* 2017) ou par voie aéroportée (Hogg, Livesey et Payne 2008). Le sol et les fèces d'animaux, non seulement d'élevage mais aussi commensaux⁶ (portage intestinal), peuvent également constituer une source de contamination.

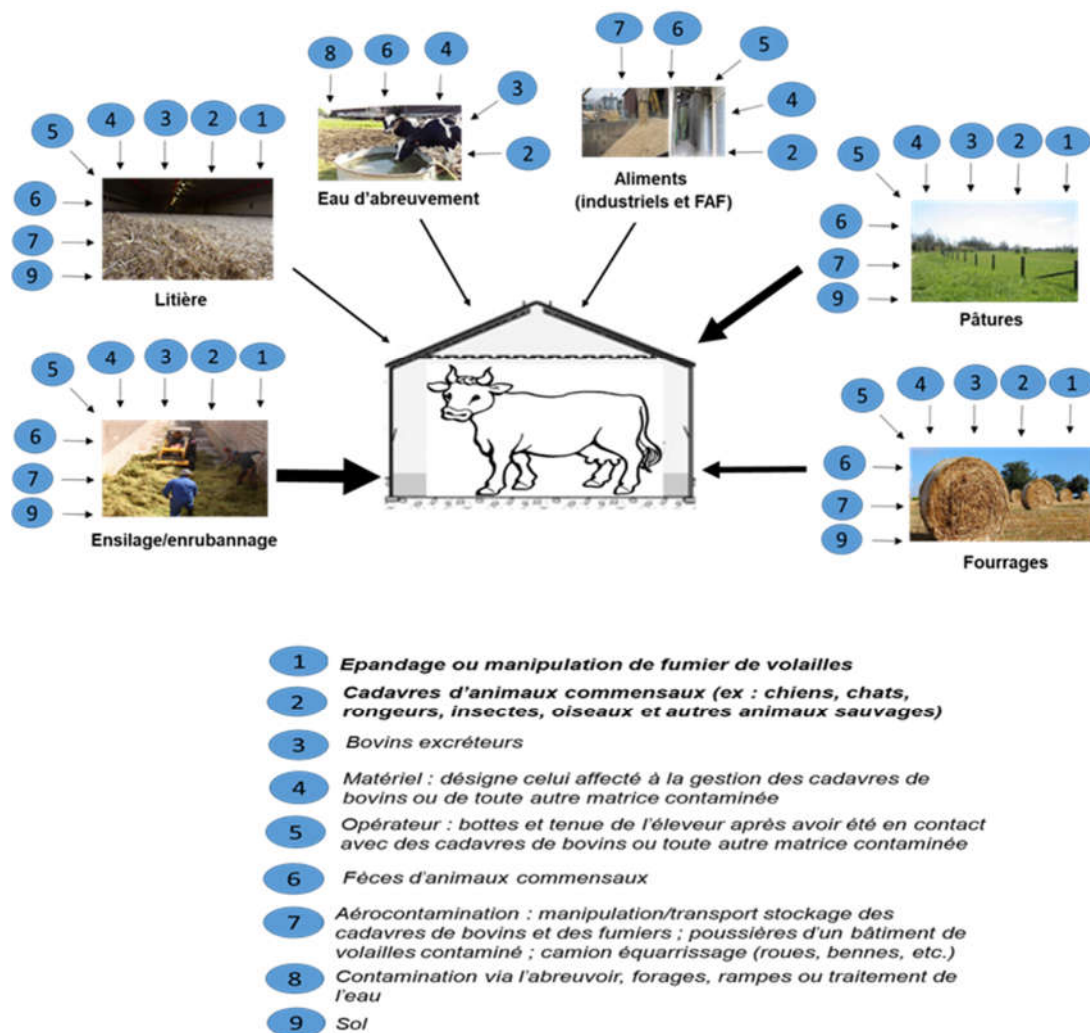


Figure 9 : Véhicules d'introduction de *C. botulinum* (forme sporulée, végétative et toxines) dans un élevage de bovins

(les véhicules les plus fréquents sont indiqués en gras, la largeur des flèches est proportionnelle à l'importance de l'introduction)

⁶ Ce terme désigne les chiens, chats, mais aussi les rongeurs, insectes, oiseaux et autres animaux sauvages présents de manière occasionnelle ou non, sur l'élevage.

Le tableau 2 présente la hiérarchisation (sur la base de l'analyse de la littérature puis de l'avis des experts) des différents véhicules de contamination de *C. botulinum* (forme sporulée, végétative et toxine) dans un élevage de bovins, par ordre d'importance décroissante. Ainsi, le fumier de volailles contaminé apparaît comme le principal véhicule de contamination de *C. botulinum*, avec l'existence d'un lien (direct ou indirect) entre l'élevage de bovins et un atelier de volailles contaminé situé à proximité. La source de contamination du fumier est constituée par les volailles porteuses asymptomatiques de *C. botulinum* qui l'excrètent dans la litière. La contamination de l'eau ou d'un aliment par un cadavre d'animal constitue également une source majeure de contamination à l'origine des épisodes de botulisme bovin. Concernant les aliments industriels, l'eau d'abreuvement ainsi que la litière des bovins, ces véhicules de contamination semblent de moindre importance, en raison des bonnes pratiques agricoles (gestion du fumier et des cadavres, conditions de stockage, nettoyage du matériel, pas d'apport de litières de volailles...) qui permettent leur maîtrise.

Tableau 2 : Présentation par ordre d'importance décroissante des principales sources et véhicules de contamination de *C. botulinum* (forme sporulée, végétative et toxine) dans un élevage de bovins

Source de contamination	Véhicule de contamination	Argumentaire de hiérarchisation
Volailles (symptomatiques ou non) excrétrices dans les effluents	Fumier de volailles	Importance quantitative de cette source de contamination en France avec l'existence d'un lien (direct ou indirect) entre l'élevage de bovins et un atelier de volailles excrétrices à proximité
Cadavres d'animaux commensaux	Ensilage ou enrubannage contaminé	Inclusion d'un animal lors de la récolte
Matériel		Double rôle du matériel : - contamination de l'ensilage, s'il n'est pas nettoyé ; - répartition de manière homogène dans toute la ration de la contamination ponctuelle (avec une désileuse mélangeuse par exemple).
Fèces d'animaux commensaux, opérateurs, aérocontamination		De moindre importance par rapport aux cadavres d'animaux et au matériel
Épandage de fumier de volailles	Pâtures	Contamination des bovins si épandage de fumier de volailles contaminé sur les pâtures (ingestion directe) ou présence d'un cadavre d'animal
Cadavres d'animaux commensaux		
Cadavres d'animaux commensaux	Autres fourrages/FAF ⁷	Contamination de l'aliment si présence d'un cadavre d'animal ou d'une matière première contaminée
Matières premières contaminées		

⁷ FAF : fabrication d'aliment à la ferme.

2.3.4 Pathogénèse et signes cliniques chez les bovins

2.3.4.1 Pathogénèse

En l'état actuel des connaissances, l'intoxication est le principal mode de contamination à l'origine des signes cliniques chez les bovins. C'est donc l'ingestion de toxines préformées au niveau de l'aliment, de l'eau ou de toute matrice contaminée qui est à ce jour considérée comme la cause de survenue du botulisme bovin. Les sources de contamination les plus souvent incriminées sont : du fumier de volailles, des cadavres d'animaux, des aliments mal conservés (défaut d'acidification des fourrages fermentés et/ou défaut d'hygiène par exemple), qui, dans des conditions d'anaérobiose propices à la croissance de *C. botulinum*, peuvent permettre leur prolifération et la production de toxine botulique.

Le rôle exact joué par la bactérie dans la pathogénèse chez le bovin reste cependant à préciser. En effet, le diagnostic du botulisme bovin est essentiellement réalisé en laboratoire *via* la détection par PCR de *C. botulinum* dans les prélèvements issus d'organes, ou de contenu d'organes, provenant d'animaux présentant des signes cliniques (foie, contenu ruminal, contenus intestinaux). De plus, il n'est pas rare lors d'un foyer de botulisme d'observer une distribution biphasique de la mortalité des bovins (Neill, McLoughlin et McIlroy 1989; Le Maréchal, Hulin, *et al.* 2019). Une première vague de mortalité est observée dans les premiers jours du foyer, très probablement liée à l'intoxication, puis une seconde vague environ deux semaines plus tard. L'origine de cette seconde vague reste jusqu'à présent inexpliquée, mais pourrait être liée à une toxi-infection. Cette hypothèse pourrait expliquer la présence de formes végétatives de *C. botulinum* mises en évidence dans le foie de bovins morts de botulisme (Le Maréchal, Hulin, *et al.* 2019). Des études complémentaires sont toutefois nécessaires pour mieux comprendre cette observation, ainsi que l'éventuel rôle que pourrait avoir la colonisation des différents organes par la bactérie dans la pathogénèse du botulisme bovin.

2.3.4.2 Signes cliniques

■ Description clinique

La toxine botulique bloquant la libération de l'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire, le botulisme se caractérise par une paralysie flasque d'évolution plus ou moins rapide et généralement ascendante, depuis le train postérieur et la queue vers la tête (Bano 2019; Kummel *et al.* 2012), mais pouvant parfois commencer au contraire par la tête (Braun *et al.* 2005). Lors de l'évolution clinique, il n'est pas observé d'hyperthermie et la sensibilité cutanée est conservée.

La période d'incubation peut varier de quelques heures à environ deux semaines, voire 25 jours (C. Le Maréchal, communication personnelle). Trois formes, dont la paralysie flasque est la caractéristique commune, sont le plus souvent décrites (École vétérinaire de Maisons-Alfort 2019, (Le Maréchal, Woudstra et Fach 2016) :

- une forme suraiguë, pour laquelle l'animal paralysé se retrouve rapidement en décubitus latéral et meurt en quelques heures ;
- une forme aiguë, associant une chute brutale de la production laitière à d'autres signes cliniques peu spécifiques, tels que de l'apathie, une difficulté à se déplacer, des désordres digestifs (constipation, diarrhée ou coliques (Kummel *et al.* 2012)), une dysphagie, une faiblesse musculaire généralement plus marquée au niveau du train postérieur et de la queue. Ces signes cliniques sont suivis par l'apparition d'une paralysie des muscles de la tête (Galey *et al.* 2000; Kummel *et al.* 2012; Le Maréchal, Druilhe, *et al.* 2019; Myllykoski *et al.* 2009; Relun *et al.* 2017) : difficultés de mastication et de déglutition, dysphagie et flaccidité de la langue, chute de nourriture par la bouche et écoulement de salive, diminution des contractions ruminales, mydriase. La paralysie se généralise ensuite aux muscles abdominaux et locomoteurs (démarche hésitante en traînant les

pieds) pour évoluer vers le décubitus sterno-abdominal. La tête est souvent positionnée en auto-auscultation voire en appui sur le sol. La mort intervient en deux à trois jours par asphyxie ou fausse déglutition ;

- une forme subaiguë, atténuée et plus lente que la précédente tout en retrouvant le même tableau clinique. La paralysie ascendante débute par le train postérieur et l'évolution peut être favorable (guérison en quelques semaines) ou non (mort en huit jours environ).

Comme décrit précédemment, au sein d'un élevage, les atteintes cliniques présentent souvent une distribution biphasique (Bano 2019) : des signes cliniques aigus associés à une mort très rapide sont observés sur les premiers animaux malades trois à quatre jours après l'exposition, puis les autres animaux atteints peuvent présenter des signes cliniques 14 à 21 jours après le début de la maladie dans le troupeau (Bano 2019; Galey *et al.* 2000; Le Maréchal, Hulin, *et al.* 2019; Myllykoski *et al.* 2009; Neill, McLoughlin et McLroy 1989; Relun *et al.* 2017). Dans le cas de foyers de type C, certains animaux peuvent récupérer (Bano *et al.* 2015; Le Maréchal, Hulin, *et al.* 2019).

D'autres signes cliniques, tels que des difficultés respiratoires, peuvent être observés et sont susceptibles d'orienter le diagnostic vers d'autres affections (Braun *et al.* 2005; Galey *et al.* 2000; Joubert, Chirol et Beaureau 1969; Kummel *et al.* 2012; Myllykoski *et al.* 2009; Prevot *et al.* 1955). Une respiration de type abdominale chez les animaux gravement atteints a également été décrite (Fjolstad et Klund 1969; Galey *et al.* 2000).

En règle générale, le botulisme bovin se traduit par une forte mortalité, pouvant atteindre 90 % de l'effectif exposé.

■ Aspects méconnus et non couverts du botulisme bovin

Il convient de faire état d'un certain nombre d'aspects méconnus du botulisme bovin :

- la distribution biphasique des atteintes cliniques chez les bovins, décrite lors des foyers de botulisme, reste inexpliquée même si certaines hypothèses sont avancées sans pouvoir être confirmées (cf. Pathogénèse) ;
- la sensibilité et la réceptivité des bovins à chaque type toxinique (C, D, C/D et D/C) ne sont pas connues de manière exhaustive ;
- des interrogations demeurent quant à la survenue de formes frustes, dont les signes cliniques restent très peu évocateurs et de formes atypiques caractérisées à l'échelle du troupeau par des épisodes cliniques pouvant s'étaler sur une période de plusieurs mois (Kuntz, Gelin et Villaggi 2020) ;
- l'analyse des sérums chez les bovins se révèle souvent négative par le test de létalité sur souris. Ceci peut paraître surprenant compte tenu du fait qu'il a été démontré que la toxine de type D/C est celle qui montre la plus forte toxicité chez la souris parmi les différentes toxines botuliques (Nakamura *et al.* 2010). Une des hypothèses pour expliquer ce résultat négatif serait que la toxine n'est plus circulante au moment de la réalisation du prélèvement de sang et ne peut donc pas être mise en évidence lors du test sur souris. De plus, le manque de connaissances sur le mécanisme exact de translocation de la toxine botulique à travers la barrière intestinale ne permet pas à ce jour d'expliquer cette observation.

2.3.5 Présence et concentration dans les tissus animaux

Afin de répondre aux questions de la saisine, il est nécessaire d'identifier, en s'appuyant sur les publications scientifiques ayant trait au botulisme dans l'espèce bovine, les parties du corps, tissus et sécrétions éventuellement manipulés et/ou destinés à la consommation humaine qui, en fonction du statut clinique des animaux, contiennent l'agent pathogène et/ou sa toxine, et à quelles concentrations.

Plusieurs statuts caractérisent les bovins appartenant à un cheptel atteint de botulisme : malades (présentant des signes de botulisme), futurs malades (en incubation), animaux convalescents (guéris cliniquement) et animaux restés et qui resteront indemnes (ayant ingéré une quantité trop faible de toxine et/ou ne développant pas de toxi-infection ou non exposés si la contamination au départ n'est pas homogène).

De fait, les données disponibles sont, dans leur majorité, celles découlant des opérations de diagnostic portant soit chez des animaux malades, soit sur leur cadavre. Très peu concernent des bovins en période pré-symptomatique, convalescents ou non exposés. De plus, lorsque les prélèvements sont effectués à l'établissement d'équarrissage, le délai de leur réalisation après la mort des animaux, la température à laquelle les cadavres ont été maintenus et les conditions de leur acheminement vers le laboratoire sont autant de paramètres pouvant compromettre la validité des analyses. Enfin, l'absence de méthode normalisée pour détecter *C. botulinum* ou la toxine botulique dans les tissus animaux, notamment en ce qui concerne les conditions de culture et d'enrichissement, explique que les méthodes utilisées varient d'une étude à l'autre et qu'il est très compliqué de dresser une synthèse des résultats, comme de déterminer avec certitude les niveaux de contamination.

Nonobstant ces réserves, la détection de la toxine botulique est habituellement pratiquée par un test d'inoculation à la souris, mais les résultats peuvent être mis en défaut lorsque les concentrations sont en deçà du seuil de détection de la méthode. À cet égard, le test Endopep-MS, plus sensible (Hedeland *et al.* 2011; Tevell Åberg, Karlsson et Hedeland 2020) pourrait être plus performant pour détecter la toxine botulique dans les tissus, mais il est peu utilisé en pratique, du moins dans le cadre du diagnostic. La recherche de la bactérie est de plus en plus fondée sur la détection par PCR du gène codant pour la toxine après mise en culture du prélèvement dans un milieu d'enrichissement en anaérobiose. La PCR remplace ainsi le test sur souris antérieurement utilisé pour rechercher et caractériser la toxine produite dans le milieu lors de la culture.

En raison de leur impact possible en santé publique et en se focalisant sur *C. botulinum* de type C, D, C/D et D/C, sont présentées ici les données relatives à la présence de la bactérie (formes végétatives et spores) et de sa toxine dans le tube digestif, le sang et différents autres tissus, et enfin, la mamelle et le lait.

2.3.5.1 Présence dans le tube digestif

La présence des agents pathogènes et/ou de leur toxine dans le contenu du tube digestif a deux conséquences : du vivant de l'animal, les souillures fécales peuvent entraîner une contamination de surface de la peau et des phanères, et également du lait au moment de la traite (contact avec la mamelle et le matériel de traite, projection dans le lait de particules de fèces) ; à l'abattoir une contamination en surface de la carcasse est possible durant les opérations de dépouille (contact avec le cuir) ou durant l'éviscération (contamination fécale).

Cette présence sera ici évaluée dans trois contextes, le portage asymptomatique, le portage en cas d'expression de signes cliniques et l'éventuel portage en phase qualifiée d'incubation. Les différentes formes (spore, forme végétative et toxines) seront considérées.

Les animaux peuvent être **porteurs asymptomatiques** de *C. botulinum*, soit parce qu'ils sont naturellement résistants à certains types toxiques, soit du fait d'un portage de faible ampleur ou transitoire dans leur tube digestif. Quelques études, issues d'équipes allemandes, hollandaises ou suédoises, renseignent sur les prévalences de portage asymptomatique (déterminées à partir de l'analyse par PCR des enrichissements par culture de fèces) observées dans la population bovine générale. Les résultats de ces études sont variables :

- aucun échantillon avec résultat positif pour *C. botulinum* (types A, B, C, D, E et F) sur 382 fèces (issues de 39 bovins) prélevées en élevages et analysées dans Schmid *et al.* (2013) en Bavière, suggérant l'absence de portage détectable par la méthode mise en œuvre ;
- un seul échantillon positif sur 25 fèces prélevées à l'abattoir dans l'étude de Klarmann (1989) ;

- 7,4 % des échantillons positifs (prélèvements fécaux et de liquide ruminal) issus de 1 390 vaches laitières, dont 79 % de type A, 7,3 % de type B, 8,2 % de type D, 0,9 % de type E et 4,6 % de type F (Fohler *et al.* 2016), la recherche de toxine par inoculation à la souris dans les fèces prélevées dans le rectum s'avérant négative (Seyboldt *et al.* 2015). Sur la base de cette étude, Fohler *et al.* (2016) ont estimé à environ 8 % le taux de portage digestif de *C. botulinum* (tous types confondus) chez les vaches laitières dans le nord de l'Allemagne ;
- 73 % des échantillons de fèces collectés sur 60 vaches analysées en Suède avec résultats positifs pour *C. botulinum* de type B, et aucun pour les types E et F (les types C et D n'étant pas recherchés) (Dahlenborg, Borch et Rådström 2003). Pour 64 % de ces échantillons avec résultats positifs, la concentration en spores était considérée inférieure à quatre spores/gramme (1,5 à 4 /gramme après évaluation *via* une méthode statistique). Cette étude rapporte un effet de saisonnalité, avec une prévalence plus élevée en hiver qu'en été, explicable par les différences d'alimentation et d'entretien des animaux selon la saison, les animaux étant moins exposés l'été.

Il ressort de ces études que *C. botulinum* peut être détecté dans le tractus digestif (contenu intestinal et du rumen) d'animaux en dehors de tout contexte clinique, mais la plupart du temps en limite de détection des méthodes de laboratoire (ce qui explique probablement en partie les disparités observées entre les études).

Il ressort en outre que, contrairement au type B, les types C, D et mosaïques sont rarement isolés (ou alors avec une très faible prévalence, comme c'est le cas pour le type D dans l'étude de Seyboldt *et al.* (2015) dans les échantillons fécaux provenant de bovins sains. Cela contraste avec le fait que la majorité des épisodes botuliques chez les bovins soit due aux types D, D/C ou plus rarement C ou C/D auxquels ces animaux sont pourtant moins sensibles (Bano *et al.* 2015). Des études soulignent néanmoins qu'un portage digestif peut être détecté de manière transitoire et/ou intermittente dans des cheptels bovins apparemment sains situés à proximité d'élevages de volailles atteints de botulisme de type C/D : il a été ainsi montré que trois fèces sur 32 prélevées sur des bovins étaient positives lors d'une 1^{re} visite, puis que toutes les fèces de ces mêmes 32 bovins étaient négatives lors de la visite suivante, réalisée 2 mois plus tard (Souillard *et al.* 2015).

Chez ces animaux, il est vraisemblable que la croissance de *C. botulinum* soit limitée sous l'effet des compétitions microbiennes s'exerçant au sein du microbiote intestinal. On notera en outre, même en cas de présence de la bactérie, l'absence de détection de toxine dans les prélèvements fécaux (Seyboldt *et al.* 2015). Si une production de toxine botulique a lieu, elle est limitée et sans effet chez l'animal, potentiellement du fait d'un possible équilibre entre production et dégradation microbienne de la toxine (Allison, Maloy et Matson 1976; Dahlenborg, Borch et Rådström 2003; Lindström *et al.* 2010).

Dans les cheptels atteints, la proportion de bovins qui expriment cliniquement la maladie est très variable, dépendant notamment du type botulique en cause et de la quantité de toxine ingérée. Le fait que des échantillons de contenu intestinal et de rumen soient régulièrement collectés pour le diagnostic après mort ou euthanasie des animaux suspects permet de disposer de données assez nombreuses sur la présence de la bactérie dans les échantillons de contenu intestinal et du rumen de ces animaux. La toxine botulique est peu recherchée en routine. Les analyses correspondent en général à la recherche des spores par détection du gène codant pour la BoNT par PCR après chauffage 10 minutes à 70 °C et mise en culture des échantillons. Les résultats expriment, toutefois, une certaine variabilité :

- certains auteurs indiquent une proportion importante de résultats positifs, comme Bano (2018) à propos des opérations de diagnostic menées dans plusieurs foyers (7 de type C et 22 de type C/D) en Italie (détection de la bactérie dans 68 sur 69 prélèvements rectaux analysés);
- de nombreux auteurs rapportent, en revanche, des résultats marqués par un taux bien plus faible de positifs. Ainsi :
 - dans un élevage laitier infecté (neuf bovins malades sur 90) après consommation d'ensilage contaminé, Myllykoski *et al.* (2009) ont détecté *C. botulinum* de type C dans le contenu intestinal et le contenu du rumen (et le foie) d'un seul des trois bovins testés. La toxine botulique de type C a aussi été détectée (test sur souris) dans les mêmes prélèvements de ce seul animal ;

- dans le suivi d'un foyer dû à *C. botulinum* de type C, Neill, McLoughlin et McIlroy (1989) ont rapporté n'avoir pu détecter la bactérie, sur 10 prélèvements de fèces et de jus de rumen issus de bovins morts ou euthanasiés, que dans un seul échantillon de fèces, et la toxine dans aucun ;
- quelques données collectées en France lors d'épisodes cliniques suivis par le LNR montrent que :
 - lors d'un épisode de botulisme bovin de type D/C en décembre 2019, les prélèvements de sept animaux présentant des signes cliniques ont été analysés. La source de contamination à l'origine de cet épisode était du fumier de volailles. *C. botulinum* n'a été détecté dans aucune des fèces analysées (seuls les foies et contenus du rumen de deux animaux se sont révélés positifs). Ces fèces ont été prélevées sur six animaux morts parmi les sept évoqués et sur une génisse avec signes cliniques faibles. Les fèces de deux bovins de ce même cheptel ont été analysées en juin 2020 et n'ont pas permis de détecter *C. botulinum* ;
 - lors d'un épisode de botulisme bovin de type D/C étalé sur plusieurs mois en 2020 avec des formes frustes, *C. botulinum* n'a été détecté que dans un seul prélèvement de fèces sur les deux animaux analysés (animaux morts) et uniquement dans une des deux prises d'essais (l'analyse avait été réalisée en double). L'atelier volailles de l'élevage était la source de contamination avec de nombreux échantillons d'environnement positifs en *C. botulinum* D/C ;
 - lors d'un épisode de botulisme bovin de type D/C en 2020, les fèces de deux animaux étaient négatives (fèces prélevées sur un animal mort pour lequel le contenu du rumen était positif et les secondes fèces, prélevées sur une génisse avec des signes cliniques faibles (début de la maladie)) ;
 - lors d'un épisode de botulisme bovin de type D/C en 2019, les fèces de deux vaches sur les trois analysées étaient positives pour *C. botulinum* D/C. Les fèces positives ont été prélevées sur deux animaux morts, les fèces négatives avaient été prélevées sur une vache en début de phase clinique.

Ainsi, contrairement à ce qui a été observé par Bano (2018) lors d'un épisode de type C, il apparaît que la détection de *C. botulinum* type D/C dans les fèces de bovins lors d'épisodes cliniques, y compris au début des signes cliniques, est peu fréquente, suggérant une faible émission dans les fèces.

Peu d'études, en revanche, portent sur la recherche de la bactérie et sa toxine dans le tractus digestif de **sujets en incubation** (avant l'apparition des 1^{ers} signes cliniques). Dans ce contexte, Bano (2018) indique, à propos du suivi d'un cheptel atteint de botulisme de type C, que les fèces constituent un bon prélèvement chez les animaux vivants, surtout en début d'épisode clinique. Steinman *et al.* (2006) ont détecté *C. botulinum* de type D dans les échantillons fécaux de cinq bovins affectés et 23 des 36 (64 %) échantillons fécaux de bovins non affectés dans des troupeaux atteints. En revanche, une étude récente menée en France par le LNR dans un élevage atteint par *C. botulinum* de type D/C n'a pas permis de détecter la bactérie dans les échantillons fécaux de 10 bovins non affectés (l'un de ces animaux présentant les premiers signes de botulisme quatre jours plus tard).

Quelques études ont porté sur des bovins appartenant à des cheptels ayant un historique de botulisme. Il peut donc s'agir de bovins n'ayant développé aucun signe clinique ou de bovins guéris. Dans les foyers dus aux types D, D/C, C ou C/D la guérison est rare, et surtout décrite avec le type C (Bano *et al.* 2015; Bano 2018). Une étude récente (Le Maréchal, Hulin, *et al.* 2019) a permis de mettre en évidence le portage de *C. botulinum* de type C, un mois environ après l'apparition des signes cliniques, chez quatre animaux convalescents d'un élevage bovin français touché par le botulisme du même type toxinique. Par ailleurs, Bano *et al.* (2015) ont détecté 11 échantillons fécaux positifs sur 14 analysés, collectés 50 jours après détection du cas index dans un élevage italien également affecté par *C. botulinum* de type C.

2.3.5.2 Détection dans le sang

Le botulisme est la conséquence de la diffusion de la toxine botulique dans le sang qui permet son transport vers les cellules cibles. Aucune bactériémie⁸ à *Clostridium botulinum* n'a jamais été rapportée chez des animaux malades. Cela n'exclut pas, pour autant, l'éventualité d'un passage de spores depuis le tractus digestif dans la circulation sanguine en phase pré-agonique ou sous l'effet d'un stress chez les porteurs digestifs, situation décrite chez le porc mais non documentée chez les bovins, qui permettrait la localisation de spores dans certains tissus.

La présence de toxine dans le sang fait suite à son passage à travers la barrière digestive. Principalement dépendante du type toxinique, l'intensité du transfert à travers la barrière digestive est néanmoins également fonction de la quantité de toxine ingérée ou produite *in situ* dans le milieu digestif.

Une quantité faible de toxine peut générer des formes frustes, comme l'ont montré Neill, McLoughlin et McIlroy (1989) après avoir alimenté deux veaux de 200 kg avec un ensilage de litière de volailles responsable d'une flambée de botulisme de type C dans un cheptel bovin. Les seuls effets observés, au 49^e jour, étaient une légère ataxie (transitoire) et la détection d'une faible quantité de toxine circulante correspondant à 1 et 1,5 MLD₅₀/mL. Dans cette observation irlandaise, sous-entendant par ailleurs une distribution irrégulière de la toxine préformée dans l'aliment, le botulisme avait durement frappé le cheptel (80 bovins touchés dans un effectif de 150) et les concentrations sanguines détectées sur 18 des 22 animaux les plus sévèrement atteints variaient de 2,8 à 354,8 MLD₅₀/mL.

Mais, souvent, la quantité de toxine botulique dans le sang prélevé une fois apparus les signes cliniques chez les bovins, en particulier dans les cas de botulisme D, D/C, C et C/D, devient trop faible pour être détectée par le test de référence d'inoculation à la souris. L'hypothèse avancée est que la toxine a quitté le flux sanguin pour se fixer sur les récepteurs localisés sur la terminaison des neurones cibles (Myllykoski *et al.* 2009; Guizelini *et al.* 2019). Les résultats obtenus par cette méthode sont ainsi fréquemment négatifs, comme le souligne Bano (2018) en rapportant l'absence de toxine détectable dans l'ensemble des 47 échantillons sanguins prélevés sur des bovins malades lors des opérations de diagnostic dans plusieurs foyers de type D/C ou C en Italie.

En résumé, ces données permettent de supposer que la quantité de toxine présente dans le sang des bovins en incubation pourrait être la plus importante juste avant l'apparition des signes cliniques, sa fixation sur ses récepteurs s'accompagnant, d'une part, de l'apparition des signes paralytiques, d'autre part d'une réduction de sa concentration sanguine. Cette concentration peut néanmoins se maintenir à un niveau détectable chez certains animaux après apparition des premiers signes cliniques comme cela a pu être décrit par Neill, McLoughlin et McIlroy (1989) sur les 18 bovins sévèrement touchés (sur 22 testés) évoqués ci-dessus.

2.3.5.3 Détection dans différents autres tissus

L'essentiel des données disponibles concerne le tissu hépatique. Van Nieuwenhuysen *et al.* (2019) ont ainsi rapporté, lors d'un grave épisode (174 morts en six jours sur 196 animaux) de botulisme de type D/C dans un élevage bovin, avoir détecté dans les échantillons hépatiques des trois premiers animaux morts, la bactérie (par PCR) dans les trois prélèvements et la toxine (test sur souris) dans deux prélèvements. Actuellement, le prélèvement d'un échantillon de foie après la mort ou l'euthanasie des animaux suspects est systématiquement préconisé pour le diagnostic et permet souvent d'identifier la maladie en l'absence de toxine détectable dans le sang. La nature même de ce prélèvement ne permet pas, en revanche, de déterminer à quel stade de l'incubation les bactéries et/ou les toxines peuvent être détectées.

⁸ La bactériémie se définit comme le passage de bactéries dans le torrent circulatoire sans multiplication. Le phénomène peut faire suite à l'invasion d'un organisme par un microorganisme pathogène (bactériémie tuberculeuse par exemple) ou être un événement occasionnel, conséquence d'un défaut de perméabilité de la barrière digestive (bactériémie digestive).

Peu de données, issues en général d'analyses ponctuelles, concernent les autres tissus. Elles résultent d'analyses pratiquées sur des tissus prélevés après la mort ou l'euthanasie des animaux et les résultats dépendent donc du délai et de la qualité de réalisation des prélèvements effectués. Il est difficile, par ailleurs, de définir si le faible nombre de résultats positifs rapportés dans la littérature tient à l'absence habituelle de toxine ou bactéries dans ces tissus, ou sont le fait des pratiques liées au diagnostic limitant les prélèvements aux seuls foie, sang et contenu digestif.

- La présence de toxine botulique dans les viandes et abats des animaux morts de botulisme (ou euthanasiés) est la conséquence de sa diffusion sanguine faisant suite à son passage à travers la barrière digestive. La quantité de toxine détectée dans ces tissus dépend donc de la quantité circulante.
- La présence de toxine botulique dans les tissus musculaires a été montrée par Neill, McLoughlin et McIlroy (1989). Recherchant la toxine chez des vaches atteintes de botulisme de type C, ces auteurs l'ont détecté dans la langue (3,3 MLD₅₀/g) et les muscles squelettiques (4,6 MLD₅₀/g) d'un animal présentant une forte quantité de toxine circulante (354,8 MLD₅₀/mL), mais ne sont pas parvenu à la détecter chez un animal pour lequel la quantité circulante était faible (2,8 MLD₅₀/mL). Dans cette étude, la toxine était encore détectable dans un échantillon de muscle conservé à - 20°C durant 7 mois.
- La possibilité de détecter *C. botulinum* et/ou la toxine dans certains organes tels que les reins et la rate est aussi signalée dans quelques publications, comme celle de Neill, McLoughlin et McIlroy (1989) (caractérisation de *C. botulinum* de type C dans le rein d'un bovin ayant montré des signes de botulisme deux semaines après le retrait de l'aliment contaminé) ou celle de Fernández *et al.* (1989) (caractérisation de *C. botulinum* et sa toxine dans le rein et la rate d'un bovin mort de botulisme de type D, et *C. botulinum* dans le rein d'un bovin mort de botulisme de type A en Argentine).
- La suggestion de présence de *C. botulinum* et de la toxine botulique par Böhnelt, Wagner et Gessler (2008) dans les amygdales de bovins, qui serait expliquée par une colonisation des cryptes des amygdales où se développerait un environnement anaérobie, par des spores issues de l'environnement, et la production de toxine *in situ* n'a pas été confirmée par d'autres publications. Cette observation, faite à partir d'amygdales issues de bovins atteints de botulisme ou prélevées à l'abattoir souffre de la fragilité de la méthode utilisée au laboratoire.

En résumé, en dehors du tissu hépatique, peu de données sont disponibles sur la présence du danger dans les viandes et abats issus d'un bovin exprimant les signes de la maladie, et pour ceux en phase d'incubation.

2.3.5.4 Présence dans la mamelle et le lait

Nonobstant le risque de contamination du lait durant les opérations de traite (contamination fécale), la question se pose, d'une part, de la diffusion éventuelle de la toxine circulante dans la mamelle et dans la sécrétion lactée chez un animal malade ou en incubation et d'autre part, d'une localisation de la bactérie dans le tissu mammaire avec passage dans le lait chez ces animaux.

Deux publications issues d'une même équipe (Böhnelt, Neufeld et Gessler 2005; Böhnelt et Gessler 2013) rapportent la détection de *C. botulinum* et/ou la toxine botulique dans le tissu mammaire et le lait. Il demeure cependant difficile, au regard de la méthodologie appliquée, de considérer ces résultats, qui n'ont pas été confirmés par d'autres publications (cf. rapport du GT socle).

Pour la majorité des chercheurs, la faible quantité voire l'absence de toxine botulique détectable dans le sang des vaches atteintes de botulisme permet de présumer l'absence de diffusion dans la sécrétion lactée. Une étude de Moeller *et al.* (2009) indique qu'aucune des trois vaches auxquelles a été injectée de la toxine de type C n'avaient montré de trace de passage de la toxine dans le lait (Moeller *et al.* 2009). Une incertitude persiste, due à la faible sensibilité des méthodes de détection par le test d'inoculation à la souris avant d'éliminer cette possibilité de passage de la toxine dans le lait. Ainsi,

Bano (2019, 2018), en suivant un troupeau laitier atteint de botulisme de type C (21 cas, soit 40 % du cheptel, se sont succédé pendant 14 jours) à la suite de la contamination de l'aliment par un cadavre de chat, ne détectent dans le sérum et le lait prélevés à deux reprises (8 et 14 jours après le cas index) sur 12 vaches malades, ni la toxine, en utilisant le test sur souris et la méthode Endopep-MS, ni la bactérie, en utilisant la méthode PCR en temps réel après enrichissement. Ils ne détectent pas, non plus, par PCR, la bactérie dans le lait de tank (8 et 16 jours après le cas index). Ces auteurs démontrent ainsi, dans cet épisode, l'absence de toxine et de spores de *C. botulinum* détectables dans le sang circulant comme dans le lait des vaches malades, et l'absence de spores de *C. botulinum* détectables dans le lait de tank collecté sur l'ensemble du troupeau, analysé au milieu et après la fin de l'épisode clinique.

En résumé, en dehors d'une contamination d'origine fécale du lait lors de la traite, pour des vaches exprimant des signes cliniques, et donc *a fortiori* pour des animaux en incubation, la sécrétion lactée ne contiendrait ni la toxine ni la spore ni la cellule végétative, et il en est de même pour la mamelle.

2.4 Denrées alimentaires d'origine animale (DAOA)

2.4.1 Prévalence, croissance et toxinogénèse dans les produits laitiers et carnés

2.4.1.1 Données de prévalence dans les DAOA (types C, D, mosaïques C/D, D/C)

- Méthodes mises en œuvre pour déterminer la présence de *Clostridium botulinum* dans des échantillons alimentaires

C. botulinum est recherché depuis plusieurs décennies (de nombreux articles déjà dans les années 1960 en attestent) dans des échantillons alimentaires, cliniques ou environnementaux et sa présence a été mise en évidence par des techniques variées évoluant au gré des progrès apportés dans les méthodes de détection des bactéries pathogènes. Ces techniques incluent notamment (i) la détection de la toxine botulique dans le bouillon d'enrichissement d'un échantillon par un test sur souris, qui reste la méthode de référence, et la détermination du type de toxine par séroneutralisation, ou (ii) la détection par méthodes moléculaires d'isolats bactériens possédant des gènes codant les toxines botuliques ou de leur présence dans un bouillon d'enrichissement bactérien. L'échantillon est incubé en anaérobiose et souvent chauffé (au moins à 65 °C/10 min selon la norme ISO/TS 17919:2013⁹) préalablement à l'enrichissement afin d'éliminer les cellules végétatives de bactéries compétitrices (Lindström et Korkeala 2006; Lund et Peck 2013).

La recherche de *C. botulinum* dans les aliments n'est pas pratiquée en routine, car la recherche de la toxine ne peut se faire que dans des conditions de sécurité particulières.

- Viandes et produits carnés

La bibliographie concernant la présence ou la quantification de *C. botulinum* de types C, D et mosaïques C/D, D/C dans les DAOA est très peu abondante. La contribution de Greenberg *et al.* (1966) semble être encore une référence en la matière car les quelques études plus récentes positionnent leurs résultats de détection en comparaison à cette dernière. L'analyse des études récentes a été réalisée par le GT socle (Anses 2021a). La conclusion est que dans l'ensemble des données publiées jusqu'en 1993, la mention du type C a concerné les volailles et le porc, cette détection apparaissant sporadique comparativement à celle des types A et B qui, dans un *corpus* de références où les études restent rares,

⁹ Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection de micro-organismes pathogènes dans les aliments - Détection des clostridies productrices de neurotoxine botulique de type A, B, E et F.

suggère des prévalences faibles. Une revue de la littérature récente (Rasetti-Escargueil, Lemichez et Popoff 2019) s'est intéressée aux cas humains liés aux types C, D et mosaïques. Sans surprise, en l'absence d'analyses dédiées, aucune notion de prévalence ne peut être évoquée. Cependant, cette revue rapporte quelques cas documentés d'association entre un botulisme clinique humain et la consommation de viande contaminée : pâtés de porc faits maison (dans les années 1955 en France et 1960 en Rhodésie), volaille fumée en 1972 et poulet en 2006 pour le type C, et une mention pour le type D dans du jambon salé au Tchad en 1958.

Sur la base de données de détections sporadiques malgré un échantillonnage parfois conséquent, une démarche de type NPP (nombre le plus probable) permet d'approcher le nombre de spores présentes dans un aliment donnant un résultat positif. Pour les différentes études, dans tous les cas, l'ordre de grandeur est au maximum de la dizaine d'unités par kg de viande.

■ Lait et produits laitiers

Dodds (1993) dans sa revue a décrit deux études dans le fromage pour indiquer qu'il n'y a pas d'échantillon ayant fourni un résultat positif: Taclindo *et al.* (1967) sur des fromages emballés sous vide, et Insalata *et al.* (1969) pour 50 échantillons de cheddar et edam. Une étude de Kauiter *et al.* (1982) (100 échantillons de lait en poudre et 90 de lait entier) rapporte la non-détection de la bactérie dans ces échantillons de 25 g ou 25 mL. Dans ce travail, l'absence de détection dans ces échantillons de lait permet une extrapolation quantitative à moins de 0,4 spore par kg, ordre de grandeur déjà évoqué par Dodds (1993) : « présence inférieure à une spore par litre de lait ».

2.4.1.2 Croissance et production de la toxine botulique de types C, D ou mosaïque par *Clostridium botulinum* dans les denrées alimentaires d'origine animale

Le potentiel de croissance de la bactérie dans les aliments est déterminé soit par une évaluation de la croissance proprement dite, soit par la détection de la toxine botulique. Dans cette section, la « croissance » regroupera indistinctement multiplication et toxinogénèse.

La croissance de *C. botulinum* du groupe III dans les denrées alimentaires a suscité peu de travaux. Des limites (température, NaCl, pH) de croissance pour les souches du type C ont été établies par quelques-uns d'entre eux. L'absence de croissance à 10 °C, la croissance de quelques souches à partir de 12,8 °C et la croissance de six souches sur six à 15,6 °C ont été relevées (Segner, Schmidt et Boltz 1971). Aucune croissance n'est rapportée pour des concentrations en NaCl au-delà de 3 %, pour des valeurs de pH inférieures ou égales à 4,9. Dans une DAOA (du haddock) la croissance de la bactérie s'est avérée aussi rapide que celle obtenue dans un milieu de culture au laboratoire. En l'absence de donnée spécifique supplémentaire de croissance ou de production de toxine dans les denrées alimentaires, la nature des substrats à l'origine des foyers de botulisme de type C suggère une bonne adaptation à de nombreuses matrices contenant des denrées d'origine animale.

La température, le pH ou l' a_w contrôlant la croissance des souches du groupe I (protéolytiques de type A et B) permettront très vraisemblablement également le contrôle des souches du groupe III (Roberts et Gibson 1979) ; ces dernières présentant de moindres capacités à se développer à basse température, bas pH ou faible a_w . Des conservateurs ajoutés (nitrite sous forme de sel) peuvent inhiber la croissance de *C. botulinum* et sont utilisés dans la production de certaines DAOA (e.g. en charcuterie pour maîtriser des souches du groupe I, le principal danger dans ce type de produits).

C. botulinum est une bactérie anaérobie stricte. Cependant, la conservation des aliments dans une atmosphère contenant de l'oxygène ne permet pas, à elle seule, d'inhiber la croissance de la bactérie et la production de toxine. En effet, de nombreux aliments ont naturellement un potentiel redox bas (Morris 2000). Par exemple, après l'abattage, le potentiel redox est de l'ordre de 0 mV en surface de la viande et descend à -250 mV en profondeur quelques heures après la mort. L'oxygène dissous peut

être consommé par l'oxydation de composés présents dans les matrices alimentaires ou par la croissance du microbiote naturellement présent (Lund 1993; Peck *et al.* 2008).

2.4.2 Impact des procédés de transformation/production en filière bovine

Dans la production d'aliments, la maîtrise des dangers biologiques repose sur des mesures d'hygiène ou mesures de maîtrise¹⁰:

- de rang I : elles sont d'ordre préventif visant à empêcher ou limiter le transfert des agents de leur source vers leur cible, comme le sont les bonnes pratiques d'abattage ;
- de rang II : elles sont à la fois préventives et curatives visant à empêcher l'amplification du danger (inhiber la croissance, stopper la toxinogénèse...), comme l'est l'application de la chaîne du froid ou l'introduction de mélanges salants ;
- de rang III : elles sont curatives et vont inactiver ou éliminer le danger totalement ou suffisamment. Il s'agit, le plus souvent, de traitements physiques comme le sont l'application de traitements thermiques, la filtration ou la séparation centrifuge.

Il est à noter que ces mesures peuvent être constitutives d'un niveau de transformation ou totalement déconnectée de celui-ci. Par exemple, par définition, il n'existe pas de mesures de rang III à l'abattoir.

Ces mesures pourront être utilisées seules ou en combinaison dans des approches de type « technologies de barrières ». L'ensemble de ces mesures est très important dans le dispositif général de maîtrise, leurs interrelations étant fortes. Les mesures curatives ont un rôle clé dans cette maîtrise, notamment dans leur lien avec les points critiques de maîtrise (CCP ou *Critical Control Point*) et leur caractère « essentiel ».¹¹

Les mesures d'hygiène de rang III ont une action sur le danger conduisant à :

- une **inactivation** des dangers qui peut être définie comme la perte irréversible pour le micro-organisme de la capacité à se reproduire (perte de viabilité) ou de germer (spore). Le même terme d'inactivation sera utilisé pour décrire l'effet des traitements (des mesures) sur la toxine et englobera également ce qui est appelé la destruction microbienne ;
- une **élimination** des dangers grâce par exemple à la force centrifuge ou leur rétention sur une membrane filtrante. Le produit est alors littéralement physiquement « débarrassé » de tout ou partie de ses dangers.

2.4.2.1 Procédés physiques d'inactivation

■ Paramètres d'inactivation thermique

Deux paramètres constants pour une souche permettent de prévoir l'inactivation obtenue pour un temps donné à une température donnée. Ces deux paramètres sont D_T et z {Anses, 2019 #492}. D_T est le temps de traitement thermique, exprimé généralement en minutes, nécessaire à la température T pour diviser par dix la charge microbienne. Lorsque la température de traitement augmente, la destruction des microorganismes est plus rapide et la valeur de D_T est donc plus faible. Le paramètre z est utilisé pour exprimer l'écart de température en degrés Celsius ($^{\circ}\text{C}$) pour lequel les D_T sont dans un rapport de 1 à 10. Pour la plupart des moisissures et des spores de moisissures, les bactéries et les spores de bactéries, z varie de 4 à 14 $^{\circ}\text{C}$ pour des traitements en conditions humides, avec de nombreux cas où z est voisin de 10 $^{\circ}\text{C}$. Les formes sporulées ont, en général, un z compris entre 7 et 14 $^{\circ}\text{C}$ et les formes

¹⁰ Actions et activités auxquelles il est possible de recourir pour prévenir ou éliminer un danger qui menace la sécurité des aliments ou pour le ramener à un niveau acceptable.

¹¹ Federighi 2015 – NF V01-006

végétatives un z compris entre 4 et 7 °C. Le milieu dans lequel les microorganismes sont étudiés peut modifier la valeur z .

Dans la pratique, cela signifie que lorsque la température est augmentée de z °C, le temps nécessaire pour obtenir le même résultat en termes de destruction bactérienne est divisé par 10. Lorsque la température est réduite de z °C, le temps nécessaire pour obtenir le même résultat en termes de destruction bactérienne est multiplié par 10.

Dans la littérature, la convention d'écriture est la suivante : à droite du D majuscule, en indice, est indiquée la température (exprimée en degrés Celsius) pour laquelle la valeur de D (exprimée en minutes) a été obtenue. Pour les spores de *C. botulinum* non-protéolytiques, $D_{121,1^{\circ}\text{C}} = 0,21$ min.

■ Mode d'action des traitements thermiques

Sur les cellules végétatives, la chaleur humide a un mode d'action dit multi-cibles. Ainsi, elle va dénaturer, de manière croissante avec la température, les membranes et les biomolécules. Les membranes sont souvent la première cible quel que soit le type de transfert (par convection ou conduction). La chaleur sèche est moins efficace et plus lente sur les cellules végétatives. Son action semble cibler les acides nucléiques des spores, alors que le mode d'action de la chaleur humide sur ces dernières n'est pas totalement connu. Il est toutefois décrit une dénaturation de protéines clés du métabolisme et des collapsus mécaniques des enveloppes. Ce mode d'action a été décrit il y a quelques années et semble la base de la thermobactériologie quel que soit le procédé thermique utilisé, c'est-à-dire quel que soit l'équipement, classique ou innovant, qui opère le transfert de chaleur.

■ Résistance des spores de *C. botulinum* (groupes I, II et III) à la chaleur en milieu humide

La résistance à la chaleur en milieu humide des spores de *C. botulinum* est très bien documentée, et ce depuis le début du XX^e siècle pour les spores des souches du groupe I (*C. botulinum* protéolytique, types A, B et F). Des méta-analyses récentes donnent une vision synthétique des paramètres D et z . Ainsi, $D_{121^{\circ}\text{C}}$ est estimé, à partir de 394 données, à 0,19 min pour les spores des *C. botulinum* protéolytiques, avec une valeur de z de 11,3 °C (Diao, Andre et Membre 2014). Pour les spores de *C. botulinum* non protéolytiques de type B, E et F ($n = 549$), les estimations de $D_{80^{\circ}\text{C}}$ sont comprises entre 1 min et 1,5 min avec des valeurs de z comprises entre 6,5 °C et 6,9 °C (Wachnicka *et al.* 2016). Une particularité des *C. botulinum* non-protéolytiques (Groupe II) est l'existence, dans une population, de fractions de populations résistantes à la chaleur. Ces dernières sont révélées par l'ajout de lysozyme qui favorise la germination et la reprise de croissance des spores préalablement soumises à un traitement thermique. Les valeurs de $D_{80^{\circ}\text{C}}$ de ces fractions de populations résistantes sont nettement plus élevées (estimées autour de 100 min) et leur valeur de z est estimée à 9 °C (Wachnicka *et al.* 2016). Le lysozyme est naturellement présent dans de nombreux aliments, dans le blanc d'œuf à des concentrations très élevées, mais également dans d'autres DAOA. Le lysozyme est également résistant à la chaleur et pourrait persister, après une pasteurisation par exemple (Lund et Notermans 1993).

Les seules valeurs disponibles pour les spores des souches du Groupe III ont été publiées par Segner et Schmidt (1971) : les estimations de $D_{104^{\circ}\text{C}}$ pour les souches de type C testées sont comprises entre 0,02 et 0,9 min avec des valeurs de z comprises entre 5,0 et 6,2 °C. Ces paramètres de résistance suggèrent une résistance bien supérieure à celle des spores des *C. botulinum* non protéolytiques (Groupe II), mais également très inférieure à celle des spores des *C. botulinum* protéolytiques (Groupe I) (figure 10).

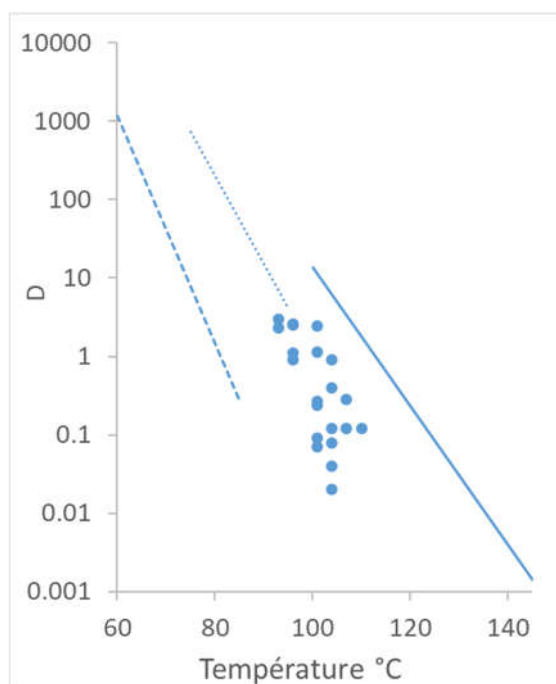


Figure 10 : Représentation schématique des relations entre la température appliquée et les valeurs du temps de réduction décimale D (minutes) pour les spores de *C. botulinum* de type I (protéolytiques) (trait plein) (Diao, Andre et Membre 2014), de type II (non protéolytiques) (tirets) (Wachnicka *et al.* 2016), des fractions de populations de spores du type II résistantes à la chaleur en présence de lysozyme (pointillés) (Wachnicka *et al.* 2016), et du type III, avec représentation des données individuelles (points) issues de Segner (Segner et Schmidt 1971)

■ Inactivation par la chaleur de *Clostridium botulinum* dans les DAOA

En dehors des travaux de Segner et Schmidt (1971), il n'existe pas de données d'inactivation des spores des souches du groupe III dans les aliments (types C, D ou mosaïques). Les spores des souches du groupe I sont les plus résistantes à la chaleur humide. En d'autres termes, leur maîtrise par un procédé thermique (par exemple appertisation avec $F_0 = 3$ min¹²) permet la maîtrise des spores des souches des autres groupes, en particulier celles du groupe III.

Toxines botuliques

Il est important de noter que les toxines botuliques sont plus facilement inactivées par la chaleur que les spores. Cependant, les données sur leur inactivation apparaissent très diverses dans la littérature scientifique selon les conditions expérimentales, le pH et la composition du milieu utilisé, entre autres. De plus, l'inactivation n'intervient pas de manière linéaire, ce qui ne permet pas les inter-comparaisons (Popoff 2017). Pour Siegel (1993) la valeur $D_{76,7^\circ\text{C}}$ pour la concentration des toxines botuliques de types A et B (chaleur humide) varie de 1 à 8 min selon le pH et la composition de l'aliment. La pasteurisation (72 °C, 15 s) permet d'inactiver 99,9 % des toxines de types A et B dans le lait (Siegel 1993; Weingart *et al.* 2010). Dans leur revue de 1979, Roberts et Gibson soulignent que la résistance thermique des toxines botuliques de types C et D est supérieure à celle des toxines de types A, B et E. Si pour ces dernières un traitement de 2 min à 70 °C suffit pour les inactiver, il faut atteindre 90 °C pour obtenir le même résultat en 2 min sur les toxines de types C et D.

Les températures et durées de traitement mises en œuvre dans les essais évaluant l'inactivation par la chaleur des toxines botuliques sont bien supérieures à celles déclenchant la sensation de brûlure chez l'être humain (50-60 °C). Ainsi, le simple réchauffage d'un aliment est insuffisant pour inactiver les toxines botuliques.

¹² Le terme « F0 » est défini comme le nombre de minutes équivalentes de stérilisation à la vapeur à 250 °F (121,1 °C) délivré à une charge.

■ Cas des procédés thermiques du lait

Pasteurisation et stérilisation

La stérilisation est un traitement thermique qui vise la destruction de l'ensemble des microorganismes (cellules végétatives et spores) susceptibles de se développer dans le lait. Dans le cas du lait, les couples temps/température suivants (ou toute autre combinaison équivalente) peuvent être appliqués :

- 120 °C pendant 20 minutes.
- 140 °C pendant 4 secondes, dans le cas de la stérilisation UHT (Ultra haute température).

Ce traitement thermique permet de conserver le lait généralement entre 6 et 9 mois à température ambiante. Dès qu'il est ouvert, le lait se garde de 2 à 5 jours maximum au réfrigérateur.

La pasteurisation est un traitement thermique qui vise à réduire de façon significative (supérieure à 6 réductions décimales) le nombre de microorganismes (cellules végétatives) présents dans l'aliment de façon à assurer son innocuité et une conservation plus longue, au froid. Les barèmes les plus connus ont été établis pour maîtriser *Mycobacterium Bovis* et *Coxiella burnetii*, ils impliquent :

- une température élevée pendant une courte période (au moins 72 °C pendant 15 secondes), ou
- une température modérée pendant une longue période (au moins 63 °C pendant 30 minutes), ou
- toute autre combinaison temps-température permettant d'obtenir un effet équivalent.

Le lait pasteurisé se conserve entre 7 et 10 jours après pasteurisation et pas plus de 48 h au réfrigérateur après ouverture.

Évaporation

La concentration par **évaporation** est un procédé qui consiste à retirer, par ébullition, de l'eau d'un produit laitier liquide. L'injection de vapeur dans des enceintes dépressurisées permet de travailler à des températures inférieures à 100 °C.

Séchage

Le séchage permet de transformer le lait (ou ses composés) en poudre, favorisant ainsi leur conservation, leur stockage et leur transport. C'est une méthode combinant évaporation sous vide et déshydratation thermique par atomisation (« *spray process* » : le lait est vaporisé sous forme de gouttelettes au sein d'une chambre à séchage (air chaud et sec) et est récupéré sous forme de poudre) ou par cylindre chauffant (« *roller process* » : le lait circule entre les parois externes de deux cylindres rotatifs proches, chauffés de l'intérieur ; il est récupéré sous forme de paillettes).

Ces deux opérations ont été analysées dans un précédent rapport de l'Anses (Anses 2020a) dont il ressort que l'évaporation a pour effet que (a) la température au sein de la gouttelette reste inférieure à celle de l'air ; (b) que la diminution de la teneur en eau rend les bactéries résistantes à la chaleur et (c) que le temps de séjour dans l'air chaud est court. En conclusion, il est difficile de considérer que l'évaporation et le séchage aient un impact de réduction sur les spores de *C. botulinum*.

■ **Autres procédés physiques d'inactivation utilisés en filière bovine**

Comme détaillé dans le rapport du GT socle, d'autres facteurs physiques peuvent être utilisés comme facteurs ayant un effet d'inactivation sur *Clostridium botulinum*, tels l'énergie de rayonnements (ionisants ou lumineux), la pression, un champ électrique ou magnétique. Dans le cadre de ce GT, en première approche, seule l'homogénéisation sous ultrapression semble concernée.

■ Cas de l'homogénéisation sous ultrapression du lait

L'homogénéisation mécanique est un traitement industriel employé pour stabiliser l'émulsion de la matière grasse du lait pour éviter la séparation de phase. Pour le lait et la crème, la phase continue est l'eau, et la phase dispersée le gras. Le lait est forcé à passer dans un entrefer très petit (0,1 mm) brisant

les globules gras pour en former, par cisaillement, de plus petits en une microseconde, permettant ainsi de ralentir considérablement leur décantation. Les performances de l'homogénéisateur dépendent essentiellement de la température et de la pression. Certains équipements récents mettent en œuvre des pressions allant jusqu'à 450 MPa. Dans l'entrefer, par conversion de l'énergie cinétique en chaleur, la température peut atteindre 120-155 °C pendant un temps très court (Reineke et Mathys 2020). Plusieurs effets s'exercent alors sur les microorganismes (dont les spores) sans exclure un probable phénomène de cavitation. Ainsi, des réductions de 2 à 6 log de spores de *Clostridium*, *Geobacillus* et *Bacillus* sont obtenues lors de la mise en œuvre du traitement (Sevenich et Mathys 2018), provenant majoritairement de la chaleur, sans exclure la possibilité d'une synergie d'effets (Georget *et al.* 2014).

En conclusion, en plus de la stérilisation et de la pasteurisation, seule l'homogénéisation sous ultrapression permettant d'atteindre, par l'application de centaines de mégapascals des températures supérieures à 120 °C dans l'entrefer, est un procédé physique d'inactivation qui a un impact réducteur sur les populations microbiennes du lait.

2.4.2.2 Procédés chimiques d'inactivation

Il s'agit dans ce cas d'aborder le cas des nitrites et de leurs actions, entre autres, sur *Clostridium botulinum*. Il s'agit de conservateurs utilisés principalement dans les produits carnés sous la forme de sels nitrités ou de nitrates qui seront transformés en nitrites par les microorganismes capables de cette réaction de réduction, souvent rajoutés comme « starters ». Lorsque le pH ultime des viandes est « normal » (valeur de 5,6) les nitrites deviennent des agents nitrosants, chimiquement réactifs, qui vont interagir avec différentes molécules (glucides, lipides, protéines) exerçant des propriétés antimicrobiennes, comme la séquestration du fer par exemple. Les bonnes pratiques de la salaison impliquent l'utilisation du mélange salant sur des viandes à évolution normale (pH 5,6) et au potentiel redox élevé.

Pour ce qui concerne le lait, aucun procédé chimique d'inactivation ne peut être envisagé comme mesure de maîtrise ; la présence de molécules à effet bactériostatique, antibiotique ou antifongique rendant réglementairement le lait impropre à la consommation humaine.

2.4.2.3 Procédés physiques d'élimination

■ Séparation centrifuge – (Bactofugation)

La séparation centrifuge est un procédé largement utilisé dans l'industrie laitière avec de multiples usages comme la clarification, l'écémage et la bactofugation, jouant sur les différences de densité entre le lait et les particules étrangères.

• La clarification

Le lait (et tous les fluides laitiers) contient des particules étrangères et des cellules somatiques qu'il convient d'éliminer. C'est l'objectif principal de la clarification qui se fait le plus souvent dans des écèmeuses/débourbeuses mais avec une vitesse de rotation du bol moindre que pour l'écémage, et des assiettes moins nombreuses et plus écartées que dans une écèmeuse. Les microorganismes dans ou sur les particules seront éliminés avec celles-ci, mais il est difficile de considérer qu'il s'agit d'une méthode d'élimination des micro-organismes, l'objectif n'est pas celui-là.

• Écémage standardisation

L'écèmeuse est un séparateur centrifuge avec un nombre plus élevé d'assiettes très proches les unes des autres. La crème dont la densité est plus basse que le lait écémé sort par l'axe central de rotation, alors que le lait se dirige vers l'extrémité des assiettes.

Dans les unités de production d'envergure, on utilise un standardisateur qui procède en deux étapes :

- séparation de la crème et du lait écrémé par une centrifugeuse à disques, permettant la clarification du lait également ;
- mélange des deux circuits dans les proportions voulues pour atteindre les spécifications du produit.

La standardisation est une opération physique permettant d'amener le lait à une concentration donnée en matière grasse ou en protéine. Ces ajustements permettent de pallier les variations de composition naturelles inhérentes à la race des vaches ou liées à leur alimentation ou aux saisons. C'est la seule modification de composition autorisée par la réglementation sans obligation d'étiquetage. Comme pour la clarification, ce procédé ne doit pas être considéré comme un procédé d'élimination ou d'inactivation des microorganismes.

- La bactofugation

Il s'agit d'une technique d'épuration du lait par centrifugation à grande vitesse, à la température de pasteurisation.

La bactofugation est un procédé destiné à éliminer par la force centrifuge les microorganismes, en particulier les spores bactériennes, présents dans le lait (Vignola et Fondation de Technologie Laitière du Québec 2002; Gésan-Guiziou 2010). La bactofugation est complémentaire de la pasteurisation mais ne la remplace pas. L'efficacité du bactofuge augmente avec la température du lait, un lait chaud (60 – 70 °C), moins visqueux, facilite (augmente) la séparation. Le lait obtenu après bactofugation est « débarrassé » physiquement de ses cellules microbiennes (mortes ou vivantes) pouvant contenir des endotoxines, alors que les laits traités thermiquement vont contenir des microorganismes « inactivés » et, éventuellement, des endotoxines « peu ou non inactivées » libérées par la lyse microbienne. Par contre, le bactofugat, très enrichi en micro-organismes, doit subir un traitement UHT si l'on veut le réinjecter dans le lait. La bactofugation n'a pas d'effet sur les exotoxines bactériennes présentes dans le lait en raison de leur faible densité.

Il est estimé que le lait bactofugé contient 90 % de microorganismes en moins, voire 99 % dans certains cas. Plusieurs ouvrages insistent sur ce taux d'élimination y compris pour les spores (élimination physique), 90 à 99 % des spores sont éliminées par la bactofugation (Alais 1984; Vignola et Fondation de Technologie Laitière du Québec 2002; Gésan-Guiziou 2010).

En conclusion, la bactofugation seule permet au mieux une à deux réductions décimales pour les bactéries et spores, un rendement d'élimination généralement considéré inférieur à celui des procédés de filtration (Trouvé *et al.* 1991). Il n'y a pas d'impact sur les exotoxines.

- Filtration - Microfiltration

La filtration sur membranes s'est développée au siècle dernier avec le développement du « *cracking* » du lait. Ce sont des procédés très utilisés pour le fractionnement du lait, les principaux procédés sont représentés dans la figure 11, les dénominations sont données par la taille des pores des membranes qui vont donc laisser passer différentes fractions.

Pour la microfiltration, le diamètre des pores de la membrane est de 10 µm à 0,1 µm, permettant la rétention de bactéries, l'ultrafiltration met en œuvre des pores de 0,1 à 0,01 µm. Comme son nom l'indique, l'échelle de la nanofiltration est le nanomètre. Enfin, l'osmose inverse se situe à une échelle encore plus petite.

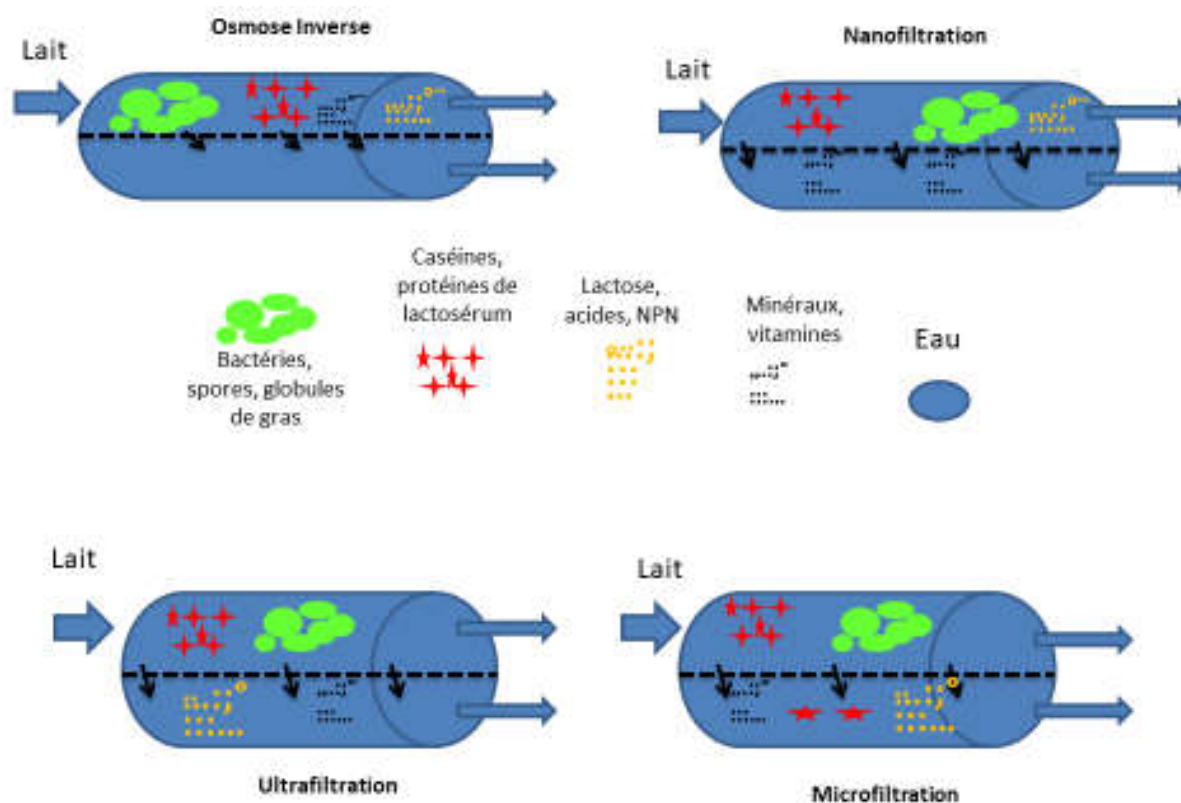


Figure 11 : Les différents procédés de filtration du lait
(NPN = composé azoté non protéique)

Les industries fromagères sont les principales utilisatrices de cette technologie, mais certaines industries laitières préparent aussi du lait frais débarrassé des microorganismes par microfiltration. Le lait entier cru est d'abord clarifié, écrémé. La crème obtenue est pasteurisée et dégazée à 85-90 °C. Le lait écrémé est microfiltré, les bactéries sont généralement arrêtées par le filtre. La crème et le microfiltrat sont ensuite homogénéisés ensemble ; le mélange est refroidi. Le rendement matière de l'opération est de l'ordre de 95,5 %. Le lait ainsi obtenu a une DLC de 15 jours à 4 °C. Commercialisé sous le nom de lait frais microfiltré, il présente les qualités organoleptiques du lait frais.

Pour Trouvé *et al.* (1991), l'abattement logarithmique moyen dans un lait écrémé microfiltré (diamètre moyen des pores 1,4 µm) inoculé avec différents microorganismes, est de 2,6 log (2,09 – 3,19 selon les microorganismes). Elwell et Barbano (2006) ont comparé les abattements logarithmiques et la durée de conservation de deux laits :

- du lait pasteurisé (79 °C, 16 s)
- du lait microfiltré (MF) auquel on rajoute son perméat pasteurisé (72 °C, 15 s).

Ils indiquent que la microfiltration donne une réduction de la population microbienne de 3,8 log et que la combinaison microfiltrat + perméat pasteurisé permet une conservation plus longue du produit (15 jours environ au réfrigérateur et 48 h après ouverture) par rapport à la pasteurisation.

En conclusion, les procédés par filtration ont un impact de réduction sur les bactéries du lait. Il n'y a pas d'impact sur les exotoxines.

2.4.2.4 Conclusion sur les procédés d'inactivation/élimination dans les denrées alimentaires d'origine animale

L'implication importante des groupe I et II dans les cas de botulisme humain a conduit les auteurs de publications scientifiques à privilégier les études sur ces groupes, délaissant le groupe III qui souffre d'un déficit d'informations en la matière. Les spores du groupe I sont souvent considérées comme une référence de « résistance » et cela a conduit, par exemple, au concept du 12D pour les barèmes d'appertisation. Leur maîtrise par un procédé thermique permet la maîtrise des spores des souches des autres groupes, en particulier des souches du groupe III.

L'état actuel des connaissances ne permet pas de remettre en cause la conclusion de Roberts et Gibson (1979) selon laquelle les mesures de maîtrise appliquées dans l'industrie agroalimentaire pour maîtriser les *C. botulinum* de types A et B seront efficaces pour les types C et D. Ceci semble pouvoir être affirmé pour les traitements thermiques des cellules végétatives et les spores. Les toxines botuliques des types C et D semblent plus thermorésistantes que celles des types A, B, E. Cependant, des traitements thermiques supérieurs à 90 °C/2 min permettent l'inactivation totale de ces toxines. L'acquisition de données nouvelles sur la sensibilité des toxines à différentes conditions de traitements physiques est recommandée.

Concernant les procédés d'élimination (bactofugation, filtrations, etc.), basés sur des critères physiques, ils ont une efficacité limitée sur les cellules végétatives et les spores en général (dont les *C. botulinum* du groupe III). Ils doivent être utilisés en combinaison si l'objectif est un abattement supérieur à 2 log. Ils n'ont pas d'impact sur les exotoxines.

En pratique, et en particulier pour les DAOA, la maîtrise de *C. botulinum* est obtenue par l'action combinée de plusieurs mesures d'hygiène et de facteurs : traitement thermique, diminution de l' a_w (ajout de sel ou séchage), ajout de nitrites ou d'autres conservateurs, fumage, réfrigération et/ou limitation de la durée de vie (Lund et Peck 2013).

Le biocontrôle ou la biopréservation constituent des voies de maîtrise de *C. botulinum* qui méritent d'être explorées à moyen terme, ce microorganisme n'étant pas connu pour être un grand « compétiteur ». Divers travaux expérimentaux ont montré un retard dans la production des toxines botuliques, voire une inhibition totale dans diverses DAOA en conditions de compétition microbienne (Lindstrom, Kiviniemi et Korkeala 2006).

Tableau 3 : Impact des procédés d'inactivation et d'élimination microbienne applicables aux DAOA sur *C. botulinum*

Procédé	Groupe type /	Forme	Matrice	Conditions	Impact	Référence
Traitement thermique ¹	I/A,B,F	Spore	Tampon	D _{121,1 °C} = 0,21 min – z = 10 °C 3 min, 12D		Kim et Foegeding (1993)
	I/A,B,F	Spore	Divers (méta-analyse)	D _{121,1 °C} = 0,19 min – z = 11,3 °C		Diao, Andre et Membre (2014)
	I/A,B	Toxine		D _{76,7 °C} = 1 à 8 min		Siegel (1993)
	I/A,B	Spore	Lait	D _{125 °C} = 0,03 min D _{135 °C} = 0,003 min		Lindström <i>et al.</i> (2010)
	I/A,B	Toxine	Lait	72 °C/15 s (pasteurisation haute)	99,5 à 99,9 % d'inactivation	Siegel (1993)
	II/B,E,F	Spore	Divers milieux et matrices alimentaires	D _{80 °C} = 1 -1,5 min z = 6,7 °C		Wachnicka <i>et al.</i> (2016)
	II/B,E,F	Spore	Divers milieux et matrices alimentaires + lysozyme	D _{80 °C} = 100 – 257 min Z = 9 °C		Wachnicka <i>et al.</i> (2016)
	III/C	Spore	Tampon phosphate	D _{101 °C} = 0,71 min* Z = 10 °C* ; z = 5,7** D _{120 °C} = 0,01 min*** D _{80 °C} = 89 min***		Segner et Schmidt (1971)
	III/C	Toxine	Non précisée	70 °C/ 2 min 80 °C/ 2 min 90 °C/ 2 min	90 % d'inactivation 99 % inactivation Inactivation totale	Prévot et Brygoo (1953) cité par Roberts et Gibson (1979)
III/ D	Toxine	Non précisée	90 °C/2 min	Inactivation totale		
Homogénéisation sous ultrapression	<i>C. sporogenes</i>	Spore	Lait écrémé	100-300 MPa 45-84 °C	0,7 réduction décimale	Cité par Georget <i>et al.</i> (2014)
	Autres bactéries sporulées	Spore	Divers matrices	200-350 MPa/55 - 85 °C	2 à 6 réductions décimales	Sevenich et Mathys (2018)
Bactofugation	Spores et cellules végétatives		Lait		1 à 2 réductions décimales	Vignola et Fondation de Technologie Laitière du Québec (2002); Gésan-Guiziou (2010)
Microfiltration	Spores et cellules végétatives		Lait		2 à 3 réductions décimales	Trouvé <i>et al.</i> (1991); Elwell et Barbano (2006)

¹ Il est convenu en microbiologie des aliments (recherche et dénombrement de spores) qu'un chauffage de 10 min à 80 °C élimine toutes les cellules végétatives ; *Moyenne des valeurs de D_{101 °C}, n=6 (Segner et Schmidt, 1971). Valeur de z estimée sur l'ensemble des données de la publication. ** Valeur de z la plus élevée communiquée par Segner et Schmidt 1971 ; valeurs calculées à partir de D_{ref}, T_{ref} et z (10 °C) en utilisant le modèle dit « de Bigelow ».

3 Maîtrise des *C. botulinum* de types C, D et mosaïques en filière viande bovine

3.1 Élevage en filière viande bovine

3.1.1 Rappel des sources de contamination

Les bovins contractent le botulisme lors de l'ingestion d'aliment ou d'eau contaminés par *C. botulinum* et/ou sa toxine. Les volailles représentent la principale source de contamination des bovins en France, quand bien même elles ne présentent pas de signes cliniques de botulisme, étant relativement peu sensibles aux types toxiques les plus dangereux pour les bovins (types D/C et C, par exemple). Différentes modalités de contamination ont été rapportées : litière de volailles ingérée par les bovins, contamination du pâturage lors de l'utilisation de litière de volailles comme amendement organique, stockage de la litière à proximité de l'élevage bovin ou de ses pâtures comme dans le cas d'exploitation mixte, contamination de l'aliment via le matériel ou un engin agricole également utilisé pour un élevage de volailles ou l'atelier avicole d'élevages mixtes. D'autres modalités sont fortement suspectées : contamination d'une pâture par voie aérienne lors d'un épandage sur une pâture voisine ou à partir de la litière stockée à proximité, notamment lorsque celle-ci est reprise en vue de son épandage.

Une autre source avérée de contamination des aliments ou de l'eau ingérés par les bovins est la présence en leur sein de parties de cadavres d'animaux sauvages ou commensaux, tels que les rongeurs, les oiseaux, les chats. L'introduction accidentelle d'un cadavre dans l'aliment peut survenir lors de la récolte (ex. chantier de récolte du foin) ou, lorsque l'aliment est déjà stocké (ex. silo d'aliment concentré dans lequel l'animal s'est introduit et est resté piégé). Ce risque est d'autant plus important pour les fourrages conservés par anaérobiose, comme les ensilages et enrubannages, leurs conditions de conservation étant favorables à la persistance et au développement de *C. botulinum*. Des pratiques agricoles non optimales lors de la récolte et de la conservation de ce type de fourrage sont donc propices à la survenue d'un épisode de botulisme chez les bovins.

Outre les cadavres, la contamination par le réservoir environnemental naturel n'est pas à négliger : le sol, l'eau, les sédiments qui, à leur tour, peuvent également contaminer les aliments et les fourrages distribués aux animaux. Cet élément met également en exergue l'importance des conditions de récolte, de réalisation et de conservation des fourrages ensilés et enrubannés.

3.1.2 Gestion des foyers de botulisme bovin

Comme indiqué précédemment, sur la base de signes cliniques plus ou moins évocateurs, le vétérinaire de l'élevage est, réglementairement, conduit à émettre cette suspicion de botulisme et en informer la DDPP. Les animaux morts et/ou cliniquement atteints feront l'objet de prélèvements cliniques ou nécropsiques en vue d'une confirmation par le laboratoire : fèces, contenu ruminal, contenu digestif, foie. La mise en évidence de la toxine dans le sang des animaux morts ou malades se révélant quasi-systématiquement infructueuse, le sang n'est plus un prélèvement de référence pour le diagnostic du botulisme bovin en France et il n'est plus utilisé en pratique.

En l'absence de mesures de gestion définies réglementairement pour ce danger de 1^{re} catégorie, le Préfet peut néanmoins décider de prendre un arrêté préfectoral de mise sous surveillance (APMS), en cas de déclaration et en fonction de la situation, sur la base de conseils prodigués par le service de la mission des urgences sanitaires (MUS) de la DGAL. En cas de confirmation par les examens de

laboratoire, voire par l'évolution éloquent de l'épisode clinique, cet APMS est suivi par un arrêté préfectoral de déclaration d'infection (APDI), ce dernier fixant les mesures sanitaires et de gestion à appliquer dans l'élevage atteint. En règle générale, un éleveur détenant un élevage bovin placé sous APDI de botulisme n'a plus la possibilité de sortir un animal de son troupeau sans que la DDPP ne délivre un laissez-passer sanitaire individuel pour cet animal, délivrance dont l'éventualité est à l'appréciation des services de la DDPP. Un tel laissez-passer n'est *a priori* accordé que sous certaines modalités et conditions, et est réservé à des animaux en parfait état de santé qui doivent être conduits à l'abattoir sans pouvoir attendre la levée future de l'APDI. Il pourrait par exemple s'agir, après une enquête épidémiologique complète, d'un animal provenant d'un lot d'animaux indemnes et non soumis au risque de contamination par l'aliment incriminé ; lot distinct du ou des lots cliniquement atteints de l'élevage. Par la suite, même après la levée de l'APDI qui intervient 17 jours après la disparition des signes cliniques sur l'exploitation, l'éleveur peut être enjoint par l'autorité administrative de renseigner précisément et compléter, selon ses recommandations, l'information sur la chaîne alimentaire (ICA) au verso de l'attestation sanitaire à délivrance anticipée (ASDA) individuelle, de tout animal quittant l'exploitation. La durée de la période pendant laquelle s'applique cette exigence est laissée à l'appréciation de la DDPP.

D'une manière générale, même en dehors de tout contexte de maladie à déclaration obligatoire, un animal malade ne doit en aucune façon être conduit vers l'abattoir. Néanmoins, la réalité pratique, notamment lorsque les signes cliniques s'avèrent frustes et ténus, peut conduire à des situations contraires.

De même, avant que la survenue des premiers cas de botulisme n'ait entraîné la déclaration de la suspicion auprès de la DDPP, l'acheminement vers l'abattoir d'un animal sans signes cliniques mais se trouvant en phase d'incubation ne peut être exclu. L'accent doit également être mis sur le délai susceptible de s'écouler entre, d'une part, le début de l'épisode de botulisme et, d'autre part, la suspicion clinique émise par le vétérinaire, suivie de la déclaration à la DDPP et de la prise de l'APMS et de l'APDI subséquents. Ce délai de latence peut être plus ou moins long et lié à différents facteurs :

- le ou les premiers cas cliniques correspondent le plus souvent à une mort très rapide des animaux atteints sans signes pathognomoniques du botulisme (forme suraiguë survenant en général 2 à 4 jours après la contamination) et sans que le vétérinaire n'en soit nécessairement informé ;
- les cas suivants (formes aiguës survenant entre 4 et 7 jours après la contamination) s'accompagnent généralement de signes plus évocateurs, mais pour lesquels un diagnostic clinique différentiel devra être réalisé avec discernement. En effet, les signes primaires de parésie progressive ascendante, de diminution de la prise alimentaire, d'inrumination ou de baisse de production laitière peuvent être retrouvés pour de nombreuses autres maladies des bovins ;
- il est donc possible que la suspicion clinique ne puisse être envisagée qu'en fin d'évolution de ces formes aiguës et ce, d'autant plus tardivement que le recours au vétérinaire sera lui-même tardif ;
- une absence de détection et/ou de suspicion clinique sont également envisageables, notamment lorsqu'un très faible nombre de cas surviennent au sein de l'élevage, lorsque les cas (peu nombreux) restent frustes ou atypiques, ou encore lorsque l'intervention du vétérinaire n'est à aucun moment requise par l'éleveur.

Ces quelques exemples soulignent le risque qu'un bovin en incubation, un bovin porteur digestif sans signes cliniques, un bovin contaminé superficiellement par *C. botulinum*, un bovin convalescent ou guéri cliniquement, voire un bovin malade présentant des signes frustes, puissent être acheminés vers l'abattoir.

Ces considérations rendent d'autant plus importante l'analyse du niveau de risque que peuvent représenter ces différentes catégories d'animaux s'il s'avère que ces derniers se retrouvent sur une chaîne d'abattage ; d'autant qu'ils ne feront l'objet d'aucune mesure de gestion adaptée, ni au cours de

leur transport, ni au sein de l'établissement d'abattage, ni au long de la chaîne alimentaire, faute d'ICA spécifique dûment renseignée.

3.1.3 Mesures de réduction du risque de botulisme bovin en élevage

Les bonnes pratiques d'élevage et la mise en place de mesures de biosécurité visant à limiter l'introduction de *C. botulinum* sont les éléments essentiels qui permettent de prévenir à la fois la survenue d'un épisode de botulisme en élevage bovin, mais également la présence de la bactérie sous ses différentes formes dans l'environnement direct des animaux (bâtiment, nourriture, logement, matériel agricole).

En ce sens, il convient de rappeler l'importance du respect de certaines de ces bonnes pratiques d'élevage qui sont à même de limiter au mieux le risque de contamination par *C. botulinum* des animaux et de la chaîne alimentaire : propreté des locaux d'élevage et des animaux, hygiène générale de l'exploitation et des zones d'alimentation et d'abreuvement, récolte et conservation optimales des aliments en général et des fourrages conservés par anaérobiose en particulier, mesures de maîtrise des animaux nuisibles et commensaux, hygiène du matériel en général et de celui dédié à l'alimentation des animaux en particulier, respect de certaines mesures de biosécurité visant à protéger l'élevage de toute contamination par d'autres voies, notamment en cas d'élevage de volailles à proximité, recours précoce au diagnostic par le vétérinaire, respect de l'interdiction d'abattage d'un animal malade ou suspect de l'être, information systématique de la chaîne alimentaire, etc.

Pour limiter le risque que pourraient représenter plus particulièrement les animaux guéris, convalescents ou porteurs sans signes cliniques, certaines préconisations, toujours inhérentes aux bonnes pratiques en élevage bovin, peuvent être renforcées pour tout animal de l'élevage conduit à l'abattoir, et ce, pendant un certain laps de temps après que le foyer clinique a été maîtrisé et que l'APDI a été levé :

- prendre les mesures nécessaires de manière que le revêtement cutané et les phanères de l'animal soient les plus propres possibles avant l'acheminement de celui-ci vers l'abattoir ;
- convenir, avec le gestionnaire de l'atelier d'abattage et le transporteur, du moment de la mise à la diète préalable de l'animal en fonction de l'horaire prévisible de son abattage ;
- indiquer en amont au transporteur que l'animal doit être acheminé seul ou isolé des autres animaux convoyés ;
- maintenir cet isolement lors du déchargement et dans la stabulation de l'établissement d'abattage.

De manière plus globale au niveau de l'élevage atteint, des mesures spécifiques de nettoyage et désinfection devront être appliquées selon les préconisations formulées dans l'APDI et avant que celui-ci ne soit levé. Avec toutes les limites qu'elles peuvent présenter en élevage bovin, ces mesures, correctement mises en œuvre, viseront à réduire au maximum la contamination de l'élevage et de son environnement par *C. botulinum*, notamment sa forme sporulée.

Les connaissances actuelles ne permettent pas de savoir si la vaccination des animaux (vaccin utilisé sous Autorisation temporaire d'utilisation (ATU) après accord de l'ANMV), régulièrement mise en place dans l'élevage après la survenue d'un foyer de botulisme dans le but de prévenir une récurrence de la maladie, peut être retenue comme une mesure permettant de réduire le portage et l'excrétion par des animaux guéris, convalescents ou porteurs n'ayant jamais présenté de signes cliniques.

L'exposition professionnelle des éleveurs n'est pas abordée dans ce rapport, cet aspect étant hors du champ de la saisine. À titre d'information, les experts indiquent que la littérature scientifique consultée dans le cadre du traitement de cette saisine n'identifie aucun cas de contamination humaine chez les éleveurs ou d'autres intervenants en élevage à la suite de la survenue d'un foyer de botulisme bovin.

3.2 Parties du corps, tissus et sécrétions présentant une probabilité d'émission du danger représenté chez les bovins par *C. botulinum* et la toxine botulique

Ce paragraphe, sur la base des données précédemment présentées (section 2.3.5), vise à désigner les parties du corps, tissus et sécrétions de bovins qui, manipulés à l'abattoir ou destinés à la consommation (viandes, abats, lait), sont susceptibles de contenir de la toxine botulique ou des spores botuliques. Les types D, D/C, C ou C/D qui sont responsables de la quasi-totalité des cas de botulisme décrits en France dans cette espèce seront principalement considérés.

Un bovin malade, en particulier s'il présente des signes paralytiques, ne peut être abattu pour la consommation. Dans ces conditions, seuls les cas suivants seront pris en compte :

- les animaux appartenant à un effectif contaminé qui sont acheminés vers un abattoir ;
- les animaux sans signes cliniques apparents, voire ceux atteints de formes frustes, présents dans un élevage reconnu atteint, après retrait de l'aliment identifié responsable de la contamination, y compris après la fin de l'épisode clinique.

Dans le laps de temps qui précède la détection du cas index, l'ensemble des bovins ayant partagé le même aliment sont considérés potentiellement en incubation. Il en est de même, au-delà de la détection du cas index et en tenant compte des délais possibles d'incubation des autres bovins du cheptel appartenant à la même cohorte d'animaux. Il faut rappeler en outre que la maladie peut aussi se déclarer après retrait de l'aliment contaminé, avec une seconde vague compatible avec une toxi-infection chez des bovins ayant ingéré, lors d'une première vague, une quantité de toxine insuffisante pour provoquer un épisode de botulisme aigu. Il faut souligner enfin que des signes cliniques frustes peuvent échapper à l'observation, dans l'élevage atteint comme à l'abattoir durant la période de stabulation précédant l'abattage des animaux.

Il est probable, mais cela demeure une hypothèse, que la possibilité de présence et la quantité de toxine dans les tissus d'un bovin en fin d'incubation s'apparente à ce qui est observé chez des animaux en début d'apparition des premiers signes cliniques, sauf pour la toxine libre circulante qui devient souvent rapidement indétectable une fois fixée dans les cellules cibles. La même approximation entre la situation de fin d'incubation et celle d'apparition des premiers signes cliniques est établie pour la bactérie, qui est rarement détectée (ou recherchée) en dehors des prélèvements de contenu digestif (intestin et rumen), lors des examens pratiqués après la mort ou l'euthanasie des animaux atteints, mais qui est retrouvée dans le foie.

Dans les autres cas (animaux chez lesquels aucun signe clinique n'est observé), le plus probable est que la localisation bactérienne se limite à un portage digestif, logiquement avec une prévalence supérieure à celle observée chez des animaux hébergés dans un élevage indemne. L'importance de ce portage est, en effet, fonction de la richesse en spores, de la durée de consommation de l'aliment contaminé (avant son retrait) et de l'amplification du cycle « excrétion fécale/ ingestion » induit par la contamination fécale de l'environnement des animaux.

Dans tous ces cas, même en tirant partie des données disponibles, les évaluations présentées dans le tableau 4 relèvent du jugement d'experts.

Si l'on considère un bovin issu d'un cheptel auquel a été distribué un aliment contaminé, avant l'apparition des premiers signes cliniques, il peut s'agir,

- soit d'un bovin sans signes cliniques, mais en incubation,
- soit, d'un bovin chez lequel aucun signe clinique n'apparaîtra, n'ayant pas consommé d'aliment contaminé ou l'ayant consommé en trop faible quantité (distribution irrégulière de la toxine préformée dans l'aliment) pour provoquer des effets visibles.

Tableau 4 : Probabilité de présence de *C. botulinum* (cellule, spore, toxine) dans différents tissus animaux en fonction du statut clinique

Sources potentielles de contamination	Cellules végétaives (-/+ /++)*	Spore (-/+ /++)	Toxine (-/+ /++)	Cellules végétaives (-/+ /++)	Spore (-/+ /++)	Toxine (-/+ /++)
	Animal demeurant sans signe clinique			Animal en incubation		
Matières stercoraires ^a (contenu des estomacs et intestins) ^a	+	++	-	++	++	++
Sang ^b	-	-	-	-	-	+ / ++
Foie ^c	-	-	-	+	-	+ / ++
Muscle ^d	-	-	-	-	-	+
Rate, reins ^d	-	-	-	-	-	+
Corée (poumons, trachée, cœur)	-	-	-	-	-	-
Nœuds lymphatiques ^e	-	-	-	-	-	+
Amygdales ^h	-	-	-	+	+	+
Tube digestif (estomacs, intestins) ⁱ	-	-	-	+	+	+
Tissus mammaire et lait ^j	-	-	-	-	-	-
Peau, pattes, onglons ^l	-	+	-	+	+	-

* : La probabilité de présence du danger (forme végétative, spore ou toxine) est estimée comme

(-) : « nulle (0) à très faible (4) » ; (+) : « faible (5) à peu élevé (6) » ; (++) : « assez élevé (7) à très élevé (9) ».

(a) : Après distribution d'un aliment contaminé, le taux de portage (spores de type C ou D) est forcément plus important que dans un environnement indemne, où il peut être estimé entre 1 et 4 %.

La probabilité de production de toxine dans le tube digestif d'un animal qui ne présentera pas de signe clinique ne peut raisonnablement être que très faible (elle peut être soit produite in situ par les formes végétaives soit résulter de l'ingestion de la toxine préformée dans l'aliment). En revanche, si le bovin est en incubation, c'est qu'il a ingéré une quantité suffisamment importante de toxine préformée dans l'aliment ou que la quantité de toxine produite in situ (toxi-infection) est assez élevée pour envisager l'apparition de signes cliniques.

(b) : Même si une diffusion sanguine ne peut être écartée en cas de stress (transport...), y compris chez un bovin sans signes cliniques ayant des concentrations importantes dans le tube digestif, l'absence de bactériémie décrite dans le botulisme rend improbable la diffusion de formes végétaives et de spores.

Dans le cas de bovins (« en incubation ») chez lesquels les signes cliniques vont apparaître, la probabilité de présence de toxine libre dans le sang est élevée à très élevée.

(c) : La présence de formes végétaives, et toxine dans le foie est largement démontrée par les opérations de diagnostic chez les bovins suspectés de botulisme avec une probabilité estimée ici, chez le bovin en incubation comme élevée. Elle est en revanche considérée comme extrêmement faible chez les autres bovins.

(d) : La présence de toxine dans le tissu musculaire, en lien avec la présence de toxine libre dans le flux sanguin, est considérée dans la catégorie faible à peu élevée chez l'animal en incubation. Les rares communications relatives à la présence de bactéries (spores ou formes végétaives) dans le tissu musculaire chez les bovins morts de botulisme conduisent à estimer cette éventualité chez l'animal en incubation comme extrêmement faible.

(e-f-g) : Les rares communications relatives à la présence de bactéries (spores ou formes végétaives) dans les différents tissus (autres que le foie) chez les bovins morts de botulisme conduisent à estimer cette éventualité chez l'animal en incubation comme extrêmement faible. La présence de toxine ne peut toutefois y être écartée.

(h) : Le cas des amygdales est particulier, avec l'hypothèse d'une localisation dans les cryptes amygdaliennes où la bactérie peut trouver un environnement anaérobie. La probabilité de présence de formes végétaives, spores et/ou toxine chez l'animal en incubation est ici estimée comme faible.

(i) : La distinction est faite entre l'intestin « tissu » et son contenu (matières stercoraires). La présence de formes végétaives, spores et/ou toxine chez l'animal en incubation ne peut être écartée dans les contenus.

(k) : La probabilité de présence de formes végétaives, spores et/ou toxine dans le tissu mammaire et le lait (hors contamination liée à la traite) chez l'animal en incubation est estimée comme extrêmement faible.

(l) : La peau peut être souillée par les fèces et la litière contaminée (notamment lors du couchage), contenant notamment des spores. Les onglons sont souillés au contact du sol et de la litière contaminée par les fèces, avec une probabilité supérieure à celle de la peau. La persistance de toxine dans les particules de fèces présentes sur la peau et sur les onglons reste hypothétique.

3.3 Transport et abattage : analyse des voies de contamination de la viande et d'exposition professionnelle des opérateurs par *C. botulinum*

3.3.1 Introduction et méthodologie du GT

La filière viande bovine est la succession d'étapes au cours desquelles des animaux de boucherie vivants deviennent des produits alimentaires. Ce passage peut comprendre jusqu'à trois niveaux de transformation.

Lors d'une **première transformation**, la carcasse et des co-produits (5^e quartier) comprenant des abats et des issues, sont obtenus.

La **deuxième transformation** permet la séparation de la carcasse en déchets (os, graisses...) et en muscles. Ceux-ci sont utilisés sans modifications importantes ou bien sont profondément modifiés pour être utilisés par la suite lors de la fabrication d'autres produits alimentaires.

Ces derniers sont obtenus lors d'une **troisième transformation** impliquant l'addition d'assaisonnement et/ou un traitement thermique.

Un abattoir est un établissement permettant de préparer les viandes, de traiter les co-produits (comestibles ou non) et de soumettre ces denrées à une inspection de salubrité en même temps qu'à l'estimation de leur qualité. Ces établissements agréés, spécialisés ou non, publics ou privés, vont donc permettre la transformation progressive d'un animal vivant issu de la filière bovine en carcasse de viande et en co-produits (comestibles (abats) ou non (issues)), lors de la 1^{re} transformation également appelée « préparation des viandes à l'abattoir ». Cette préparation consiste en une succession d'opérations unitaires connue sous le terme de « diagramme d'abattage ». Généralement, la carcasse et certains co-produits comestibles rentrent en deuxième transformation (ateliers de découpes) qui permet de récupérer le minerai viande. Celui-ci est soit utilisé sans modifications importantes (Unités de Vente Consommateur), soit plus ou moins profondément modifié pour la fabrication d'autres produits alimentaires, dits de troisième transformation, impliquant l'addition d'assaisonnement et/ou un traitement thermique (salaisons, plats cuisinés...). Par la suite, les exemples traités par le GT concerneront des produits de 2^e et de 3^e transformation.

Chez l'animal vivant en bonne santé, le muscle est un tissu stérile ou pauci-microbien. Les différentes opérations d'abattage permettent sa récupération et sa transformation en viande au cours du temps en passant généralement par trois états différents illustrés par la figure 12. Habituellement, le mot « viande » est utilisé pour désigner le muscle à l'état mûr (ou rassis), qui correspond au stade de sa commercialisation. Dans ce rapport le mot « viande » désignera indifféremment le muscle ou la viande.

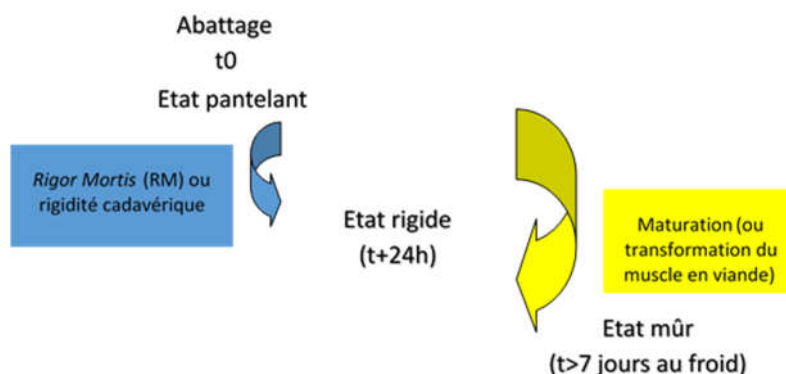


Figure 12 : Les trois états du tissu musculaire *post mortem*

À l'abattoir, les sources de *Clostridium botulinum* (formes végétatives et sporulées) sont bien connues, le lieu et les opérations de transformation aussi, ainsi que les cibles (objets de la saisine) : la viande (définition au « sens large » et exposition du consommateur par voie digestive) et les opérateurs (exposition professionnelle par différentes voies).

À l'abattoir les contaminations sont :

- *ante mortem* : elles peuvent se traduire par une contamination profonde des muscles, favorisée soit par la digestion (les bonnes pratiques d'abattage imposent de ne pas nourrir les animaux un certain temps avant l'abattage), soit par l'effet du stress subi au cours du transport, du déchargement, de combats sociaux lors d'une attente qui peut être de durée variable ;
- agonique : les bactériémies digestives agoniques correspondent au passage de microorganismes à travers les barrières intestinales « fragilisées » (stress d'abattage) vers les muscles proches ou le torrent circulatoire, si cela intervient avant la saignée. Il s'agira de contaminations en profondeur des muscles.
- *post mortem* : les contaminations *post mortem* sont des contaminations de surface généralement (environnement, personnel, matériel, équipements, cuir, aérocontamination...).

Le procédé d'abattage hygiénique consiste donc à préparer les viandes tout en évitant que les dangers ne les atteignent.

L'évolution réglementaire a fait qu'aujourd'hui chaque acteur de la chaîne alimentaire est responsable du niveau de sécurité¹³ des produits qu'il met sur le marché. Ces acteurs étant interdépendants, ils doivent tous, et chacun, élaborer et mettre en œuvre des stratégies de maîtrise des dangers, et en garder les preuves. Ces stratégies sont raisonnées à l'intérieur du triptyque de maîtrise : réglementation / éléments organisationnels / facteurs opérationnels. Ainsi, pour la maîtrise du danger *C. botulinum* en filière viande bovine, des mesures de maîtrise¹⁴ existent à l'élevage (cf. 3.1) et en 2^e et 3^e transformations. Ces mesures de maîtrise peuvent être génériques ou spécifiques, préventives ou curatives des dangers. C'est ainsi qu'afin d'avoir les meilleures conditions hygiéniques de production, un abattoir doit respecter les principes de conception et de fonctionnement suivants :

- très schématiquement, identification d'un secteur sale où se trouveront les animaux vivants et les co-produits, et d'un secteur propre correspondant au hall d'abattage et aux chambres froides ;
- la marche en avant : les produits sont transformés en avançant, sans possibilité de retour (principe de Schwarz) ;
- le non-entrecroisement du circuit sale et du circuit propre ;
- la chaîne du froid.

Au-delà, et pour compléter, le tableau 5 présente les principaux constituants du triptyque de maîtrise de *C. botulinum* à l'abattoir.

Tableau 5 : Principaux constituants du triptyque de maîtrise de *C. botulinum* à l'abattoir

Réglementation	Éléments organisationnels	Facteurs opérationnels
ICA Cadre de l'inspection vétérinaire (<i>ante</i> et <i>post</i> <i>mortem</i>)	Bonnes pratiques hygiéniques (BPH) Démarche HACCP Traçabilité produits	Sectorisation propre/sale Marche en avant Non-entrecroisement Chaîne du froid Nettoyage & désinfection

¹³ Sécurité des aliments : assurance que les aliments ne causeront pas de dommages au consommateur lorsqu'ils sont préparés et/ou consommés conformément à l'usage pour lequel ils sont prévus.

¹⁴ Actions et activités auxquelles on peut avoir recours pour prévenir ou éliminer un danger qui menace la sécurité des aliments ou pour le ramener à un niveau acceptable.

Dans son analyse, le GT a souhaité faire un développement particulier de certaines mesures de maîtrise proches des cibles (viande et opérateur (V et O)), considérant les activités constitutives de l'abattage des animaux de boucherie et les différentes formes identifiées du danger, et pour deux scénarios raisonnablement prévisibles : animal qui restera sans signes cliniques, animal en incubation.

L'exposition professionnelle des opérateurs tout au long des séquences transport-abattage concerne les chauffeurs, les bouviers et les opérateurs sur chaîne. Le GT a procédé à l'identification exhaustive des différentes possibilités d'exposition au regard des principaux modes de transmission (INRS) :

- inoculation par blessure ou coupure avec des objets contaminés ;
- ingestion manuportée (port à la bouche des mains ou d'objets contaminés) ;
- inhalation de poussières sur le lieu de travail.

Il convient de noter qu'au regard de tous les modes de transmission, les personnes les plus exposées sont les éleveurs. Pour l'exposition professionnelle, le GT a adopté la même méthodologie que pour la contamination de la viande, présentant toutes les possibilités et estimant leur importance relative, ainsi que l'efficacité des mesures de maîtrise existantes le cas échéant.

3.3.2 L'abattage - Description chronologique synthétique

Nota bene : la description suivante correspond à un abattage « standard » représentatif du fonctionnement d'une majorité d'établissements. Des nuances peuvent exister pour certains établissements notamment au regard de la conception de l'abattoir et de son niveau d'équipement.

L'abattage des bovins est encore une « industrie de main d'œuvre » (peu de tâches automatisées). Sur la chaîne d'abattage les opérateurs sont situés à leur poste fixe, ce sont les produits qui défilent devant eux selon le principe de Schwarz (marche en avant), il n'y a que le chef de ligne et les agents de maintenance en cas d'interventions qui sont autorisés à se déplacer d'un poste à l'autre et, ce, dans les deux sens. Les opérateurs de bouverie (stabulation) sont en contact direct avec les animaux vivants dont ils assurent la stabulation, et qu'ils vont diriger vers la chaîne d'abattage pendant toute la durée de la tuerie. Le chauffeur du camion assure généralement la séquence chargement-transport-déchargement des animaux, avant d'effectuer le nettoyage du camion.

À partir de la file d'abattage, les co-produits sont transférés vers les locaux de traitement du 5^e quartier où d'autres opérateurs vont procéder à leur préparation.

La journée d'abattage (ou tuerie) est entrecoupée de « pauses » pour les opérateurs. Ces pauses s'effectuent généralement en séquentiel sans arrêt total de la chaîne. La prise de nourriture et la consommation de boissons sont possibles pendant les pauses, constituant des occasions d'ingestion accidentelle de la toxine. Il est à noter que la procédure (passage par « sas hygiène ») lorsque que l'on quitte son poste de travail, pour une pause ou en fin de journée, est la même que pour la prise de poste en début de journée. Les tenues et équipements (tabliers, cottes de maille...) sont généralement nominatifs.

Transport

C'est l'acheminement des animaux de l'élevage à l'abattoir, il doit minimiser les occasions de stress pour les animaux et ne devrait pas excéder 8 h. En France métropolitaine, jusqu'à présent, le maillage territorial des abattoirs peut permettre d'éviter les temps de transport trop longs. Il est possible qu'il y ait une contamination du cuir des animaux qui se trouveraient en contact rapproché avec des animaux sans signes cliniques ou en incubation. Une mise en suspension des spores peut également se produire.

Des aires de lavage pour les camions doivent être prévues sur les sites d'abattage.

Déchargement – Inspection vétérinaire ante mortem – Traçabilité

Cela correspond à la descente du camion et l'examen en vif des animaux. Seuls les animaux ayant satisfait à l'inspection reçoivent un numéro de tuerie qui servira ensuite pour l'identification des différents produits de l'abattage, en correspondance avec le passeport du bovin (DAB bovins). Des systèmes informatiques de traçabilité permettent d'éviter la conservation des oreilles (et des boucles d'identification) jusqu'en bout de chaîne. De la même façon que lors du transport, il est possible qu'il y ait une contamination du cuir des animaux qui se trouveraient en contact rapproché avec des animaux sans signe clinique ou en incubation.

L'exposition professionnelle du chauffeur lors de la séquence chargement/déchargement/lavage est possible et il peut y avoir transmission par :

- inoculation (blessure profonde par les cornes des bovins) ;
- ingestion (contamination manuportée) ;
- inhalation de spores mises en suspension.

Stabulation

Les animaux « acceptés » vont alors être mis en stabulation (individuelle ou en petits groupes) pour une durée variable. L'un des objectifs est alors un « retour au calme des animaux ». La vision technologique et musculaire de la stabulation correspond aux rétablissements des gradients électrochimiques cellulaires et du stock de glycogène, pour une bonne transformation du muscle en viande (évolution *post mortem* du muscle). Les locaux sont conçus pour ne pas générer trop de stress et permettre une stabulation pouvant se prolonger jusqu'à 24 h pour les animaux jugés « énervés » et/ou « dangereux ». De la même façon que lors du transport et du déchargement, il est possible qu'il y ait une contamination du cuir des animaux placés en stabulation en petits groupes et qui se trouveraient en contact rapproché avec des animaux sans signes cliniques ou en incubation. Une mise en suspension des spores peut alors se produire.

Amenée – Contention

Les animaux empruntent alors un couloir d'amenée pour les conduire en file indienne jusqu'au piège de contention dans lequel ils pénètrent individuellement. La contention est nécessaire quel que soit le type d'abattage, classique ou dérogoratoire¹⁵. Il est possible qu'il y ait contamination de cuirs d'animaux via les parois du couloir d'amenée ou du piège qui seraient contaminées par des spores. Une mise en suspension des spores est également possible. L'opérateur peut subir une blessure profonde par les cornes d'un bovin.

L'exposition professionnelle des bouviers lors de la séquence mise en stabulation/amenée/contention est possible et il peut y avoir transmission par :

- inoculation (blessure profonde par les cornes des bovins) ;
- ingestion (contamination manuportée) ;
- inhalation de spores mises en suspension.

Insensibilisation

L'insensibilisation est obligatoire sauf pour les abattages dérogoratoires. Chez les bovins, sur le front de l'animal, le pistolet d'abattage (matador) avec tige captive perforante (trépanation) ou percutante (tige à masselotte) est utilisé majoritairement. À ce poste, l'opérateur doit vérifier la perte de conscience à partir de différents critères ou signes d'inconscience, à défaut il peut appliquer un deuxième coup de

¹⁵ *i.e.* pouvant déroger aux opérations classiques d'abattage (p. ex. abattage sans étourdissement préalable, certains abattages d'urgence, animaux en incapacité d'avancer ou de se relever...)

pistolet, avec l'amorce *ad hoc*. L'animal, étourdi, s'affale sur un flanc et sort du piège par l'une des deux parois amovibles. Des spores qui se trouveraient sur le tapis d'affalage pourraient alors contaminer le cuir des animaux. Une chaîne dite « de saignée » est alors passée autour du postérieur pour suspendre l'animal tête en bas. Une mise en suspension des spores peut alors se présenter.

L'électronarcose est possible en tant qu'alternative au pistolet.

Dans certains cas, à ce stade, et dans les abattoirs qui en ont fait le choix, il est possible de stimuler électriquement les animaux (*stimulation basse tension*). L'objectif est qualitatif : les contractions musculaires provoquées entraînent, par consommation d'ATP, une meilleure évolution *post mortem* du muscle (transformation du muscle en viande...).

Il convient de noter qu'au poste d'assommage, et éventuellement de stimulation basse tension, la proximité de l'opérateur avec les cornes des animaux est grande, le risque de blessure profonde est réel. Le même raisonnement peut être tenu pour le sacrificateur lors d'éborgements rituels (abattage dérogame).

Saignée – Égouttage

La saignée correspond à l'élimination de la plus grande partie du sang des animaux par ponction ou section des vaisseaux de gros calibre, respectivement à l'aide d'un trocart ou d'un couteau. L'égouttage est l'élimination gravitaire progressive du sang résiduel. L'activité cardiaque est nécessaire pour une bonne saignée (par son rôle de « pompe »). La saignée va, ensuite, entraîner la mort de l'animal par arrêt cardiaque. Elle est réalisée en position verticale pour les bovins (tête en bas) et constitue également une nécessité hygiénique car le principal fluide vecteur de contamination profonde des muscles est ainsi éliminé. Accessoirement, elle améliore l'aspect de la carcasse (viande non saigneuse). S'il n'est pas rejeté, le sang récolté sera du sang alimentaire (consommation humaine) ou du sang industriel (cruor, farines...).

Ce stade correspond à la fin des opérations sur les animaux vivants.

À ce poste de travail une exposition professionnelle est possible par (i) inoculation en cas de blessure au couteau ou par (ii) ingestion (manuportée).

Rabotage - Décrotteuse

Dans certains cas, durant l'égouttage, il est possible pour un opérateur de passer la décrotteuse sur les lignes de « traçage » du cuir (zones qui seront incisées) afin de les débarrasser des saletés recouvrant le cuir, enlevé par la suite. Il peut y avoir, alors, mise en suspension de spores se trouvant sur le cuir et donc exposition professionnelle suite à leur inhalation. Cependant, la décrotteuse étant habituellement capotée et reliée à un aspirateur, l'exposition est minimisée.

Habillage externe

Début des opérations sur les animaux non dépouillés.

Ces dernières sont souvent regroupées sous le terme « d'habillage externe » des animaux qui prendra fin avec l'enlèvement du cuir. Cet habillage externe comprend une succession de « petites opérations », dont l'ordre peut être variable, de sections (cornes, pattes...), ablations (mamelles, verge, testicules...) et incisions du cuir pour son « traçage » (ou parfente). Il est possible, sur la chaîne, qu'il y ait une contamination, par des spores, du cuir des animaux, qui se trouveraient en contact rapproché avec des animaux contaminés en surface.

Incisions pour le traçage

Le « traçage » (ou parfente) correspond à « l'ouverture » du cuir par une incision longitudinale et deux incisions transversales qui vont faciliter l'arrachage du cuir :

- incision ventrale médiane : du pubis à l'encolure (ligne blanche) ;

- incision cruciale antérieure passant par la face dorsale des membres antérieurs ;
- incision cruciale postérieure passant par la face palmaire des membres postérieurs.

Les lignes d'incision peuvent être décrottées comme vu en *supra*. Après parfente, les flancs et la face interne des membres sont dépouillés au couteau sur quelques centimètres.

Il peut y avoir exposition à des spores qui se trouveraient sur le cuir d'animaux contaminés en surface. Ce poste de travail nécessite l'utilisation d'un couteau pour chaque animal (technique du coup de lance).

L'exposition professionnelle des opérateurs lors de la séquence ablation/incision/section est possible et il peut y avoir transmission par :

- inoculation (blessure profonde lors d'utilisation d'équipements tranchants) ;
- ingestion (contamination manuportée lors de la manipulation du cuir) ;
- inhalation de spores mises en suspension.

Dépouille

C'est l'enlèvement (ou arrachage) du cuir. Le plus souvent, il est effectué par une machine ; le cuir vient s'enrouler autour d'un tambour rotatif qui se déplace verticalement, généralement du haut vers le bas. Dans ce cas de figure, si la tête n'a pas été enlevée, il est alors possible de la dépouiller en partie (et d'enlever les oreilles). Les opérateurs accompagnent au couteau le mouvement de la machine. Il peut y avoir exposition professionnelle par mise en suspension des spores qui se trouveraient sur le cuir d'animaux contaminés et par inoculation (s'il y a blessure suite à la manipulation d'un couteau).

Ligature de l'œsophage

Une fermeture hermétique de l'œsophage à l'aide d'une pince plastique vise à éviter les régurgitations. C'est la première des deux ligatures du tube digestif, elle intervient en général avant l'enlèvement de la tête.

Décollation

C'est l'enlèvement de la tête, elle peut intervenir avant ou après la dépouille. Une fois enlevée, la tête est « travaillée » pour récupérer museau, langue, viande des joues, masque, etc. Durant ce travail, il faut porter une attention particulière aux amygdales, considérées comme des réservoirs de dangers.

À ce poste, une exposition professionnelle, par inoculation lors d'une blessure, est possible au regard de la manipulation du masque et du retrait de la langue (amygdales), de même que par ingestion (manuportée).

À ce stade, les opérations sur les animaux non dépouillés sont terminées, débutent alors les opérations sur les animaux dépouillés (habillage interne). La dépouille est une opération importante sur le plan de l'hygiène, mettant à nu une surface stérile (la carcasse), qui peut alors subir une contamination superficielle par différentes voies (opérateurs, matériels, aérocontamination, contaminations par les réservoirs - contenus digestifs et intestinaux, etc.).

Habillage interne

Détourage - Ligature du rectum

Le rectum est « détourné » au couteau afin de le séparer de ses attaches musculaires et ensaché avec fermeture hermétique du sachet plastique. Le tout est replacé à l'intérieur de la cavité abdominale. Lors de l'éviscération abdominale l'opérateur se saisira du sachet, et donc du rectum, en premier. L'exposition professionnelle aux matières stercoraires (spores et cellules végétatives chez un animal sans signes cliniques ; spores, cellules végétatives et toxines chez un animal en incubation) est possible par inoculation lors d'une blessure.

Fentes du quasi et du sternum

Cela correspond aux ouvertures des cavités abdominales et thoraciques. C'est une opération à haut risque de contamination, très proche du réservoir principal de dangers microbiologiques, qu'il ne faut pas léser. Une blessure des opérateurs avec le matériel utilisé est possible.

Éviscération abdominale

Cette étape correspond à l'enlèvement des estomacs et des intestins (et du tractus génital et de la rate) qui sont déposés sur un convoyeur et évacués vers les locaux de traitement (secteur sale). Le foie et les rognons restent en place. L'opération est délicate parce qu'il faut éviter tout percement du tube digestif contenant les matières stercoraires. Ce tube digestif est ligaturé aux deux extrémités empêchant tout écoulement et fuites. La masse digestive tombe sur une goulotte par gravité et, sans contact avec l'opérateur, est évacuée vers les locaux de boyauderie.

À ce poste, l'exposition professionnelle aux matières stercoraires (spores et cellules végétatives chez un animal sans signes cliniques ; spores, cellules végétatives et toxines chez un animal en incubation), par inoculation lors d'une blessure ou par ingestion (manuportée) est possible.

Éviscération thoracique

Cela commence par la récupération des rognons et du foie (avec la vésicule biliaire), abats rouges soumis à l'inspection vétérinaire *post mortem* comme l'ensemble des viscères (cœur, poumons, trachée). Le travailleur manipule très peu ces abats rouges : il les prend dans ses mains et les dépose sur une surface pour l'inspection vétérinaire. À ce stade, ce sont les agents des services vétérinaires qui manipulent le plus ces abats, notamment le foie et sont donc les plus exposés.

Fente en demi

La carcasse, vidée de tous ses organes, peut alors être séparée en deux héli-carcasses (demi de queue (droite) et demi d'onglet (gauche)), à l'aide d'une scie passant au milieu du canal rachidien. L'opérateur doit se protéger des brisures d'os qui sont projetées.

Démédullation par aspiration

Cela correspond à l'enlèvement de la moelle épinière et des dures-mères.

Inspection vétérinaire post mortem

À ce stade, les agents des Services Vétérinaires peuvent porter un jugement de valeur sanitaire sur les différents composants de la carcasse, reconnaissant, ou non, pour tout ou partie, les produits aptes à la consommation humaine.

Émoussage

C'est l'enlèvement au couteau des gras superficiels sur le dos, les cuisses et épaules (zones réglementées).

Un jet de vapeur peut être passé sur les zones de traçage, de fente et de sections.

Pesée – Classification – Traçabilité

La pesée est réglementée par le décret du 27 juillet 1977, elle doit intervenir dans l'heure qui suit l'insensibilisation. Le poids fiscal ou poids à froid (poids fiscal = poids net constaté – 2 % pour les bovins adultes) est déterminé.

Douchage

À l'eau potable, chaude ou froide, le douchage améliore la présentation de la carcasse et la réfrigération. Cette opération est optionnelle.

Peu répandu en France, le désossage à chaud, comme son nom l'indique, s'effectue avant l'entrée en chambre froide, il est pratiqué dans certains pays et ne sera pas développé ici.

Réfrigération

Les dispositions réglementaires obligent à ce que la température interne des muscles soit abaissée à un maximum de +7 °C à cœur en 24 heures et de +3 °C pour les abats rouges.

La réfrigération a lieu en deux phases :

- ressuage (ou ressuyage, ou réfaction) permet de faire baisser rapidement la température, tout en évitant le cryochoc¹⁶ ;
- stockage au froid dynamique (avec une vitesse d'air définie) permettant de respecter les impératifs réglementaires tout en évitant le *cold shortening* (contraction/durcissement irréversible de la viande par le froid).

En chambre froide, la transformation du muscle en viande va nécessiter plusieurs jours. Le désossage (à froid) s'effectue dans des ateliers de découpe, locaux climatisés distincts du hall d'abattage, qui permettent la récupération des minerais nécessaires à la fabrication des produits choisis comme exemple dans la suite de ce rapport (cf. 3.4).

3.3.3 Cas du 5^e quartier

Outre la carcasse, la 1^{re} transformation d'un animal de boucherie aboutit à un grand nombre de co-produits, également appelés 5^e quartier. Ce sont donc « *tous les éléments obtenus à partir d'un animal de boucherie, autre que la carcasse* ». Parmi ces co-produits, on distingue :

- une partie comestible : les abats ;
- une partie non comestible : les issues.

La difficulté du sujet est que, quelquefois, un même co-produit peut avoir un usage alimentaire (donc c'est un abat) ou non alimentaire (donc c'est une issue), il est donc difficile d'obtenir une nomenclature exhaustive des uns et des autres. Les listes suivantes sont plutôt consacrées par l'usage.

Abats rouges

Sont considérés habituellement comme abats rouges : la langue, les poumons, le cœur, le foie, les reins et la queue (pour mémoire *avant ESB* + cervelle, rate, moelle épinière). Les organes sont parés, rassemblés par catégories et refroidis. Leur manipulation (ex. : rate, foie) par les travailleurs en abattoir est peu importante et nécessite peu l'utilisation de couteaux.

Pourraient être rajoutés à cette liste : les testicules (ou « amourettes » ou « rognons blancs »).

Abats blancs

Très schématiquement vont rentrer dans cette catégorie :

- les abats en « poils » : pieds, museaux et « masques » (peau de la tête) ;
- les réservoirs digestifs.

Les abats en « poils » vont être « *échaudés* » (traitement à l'eau chaude 90 °C) et « *épilés* » puis refroidis jusqu'à utilisation. Les pieds servent pour le « gras double » ou les tripes ou sont vendus au détail. Les museaux sont vendus au détail. Il existe également une valorisation non alimentaire des pieds vers la production de collagène et de gélatine. Les traitements subis par les réservoirs digestifs consistent en une séparation estomac(s)/intestins, puis une séquence d'opérations : ouverture, vidage, grattage, lavage et échaudage, puis refroidissement. Il y a ouverture des estomacs et des intestins, manipulation et « *secouage* » pour les vider. Il peut y avoir mise en suspension du danger lors de ces activités.

¹⁶ anomalie technologique qui conduit à une perte de qualité de la viande

Le contact des travailleurs avec les ganglions mésentériques et les contenus intestinaux est possible dans les locaux de traitement du 5^e quartier.

Les estomacs peuvent être valorisés en alimentation humaine. Les intestins pourront être valorisés en corderie par exemple.

Il est à noter que la préparation des abats nécessite des interventions humaines et un contact avec les différents co-produits.

L'exposition professionnelle aux matières stercoraires contenues dans les estomacs (spores et cellules végétatives chez un animal sans signes cliniques ; spores, cellules végétatives et toxines chez un animal en incubation), par inoculation lors de blessure ou par ingestion (manuportée), est possible mais est minimisée par la formation adéquate du personnel.

L'exposition professionnelle par inoculation lors de blessure ou par ingestion (manuportée) lors du parage du foie est possible.

Les issues

Les issues sont donc « tout ce qui provient de l'animal et qui n'est ni la carcasse ni les abats ». Ce sont des produits réputés non comestibles à usage industriel. Les principales issues sont :

- les gras provenant de l'émoussage et les gras mésentériques qui sont dirigés vers les fonderies (savons...) ;
- des issues diverses : cornes et sabots (engrais), vessies et utérus (parcheminerie) ;
- les cuirs et peaux : valorisées par les tanneries ;
- les os : industries de la gélatine et des colles ;
- le sang : alimentation animale, œnologie ;
- des déchets divers dont la valorisation est difficile ou quasiment impossible : les poils (brosses et pinceaux), les fœtus, les pénis, les matières stercoraires (sont stockées puis épandues sur les champs aux périodes autorisées). La manipulation des matières stercoraires est aussi source de risque professionnel. Cependant, l'importante dilution présente dans les tours à fumier, où elles sont stockées, minimise grandement le risque d'exposition.

Leur obtention à l'abattoir nécessite également des interventions humaines et une proximité avec les co-produits dont certains peuvent être une source de contamination directe ou indirecte des opérateurs.

Tous les cuirs sont étalés, refroidis et salés, généralement. Ils arrivent regroupés, souvent avec une circulation par voie pneumatique, dans le local de traitement des cuirs. L'importante manipulation qui en est faite et leur grande quantité dans les locaux créent des conditions d'exposition professionnelle aux spores (mise en suspension dans l'air).

3.3.4 Synthèse des possibilités de transfert et des mesures de maîtrise pour le transport et l'abattage

Le tableau 6 évalue les possibilités de transfert des types étudiés de *C. botulinum*, sous ses différentes formes, vers la viande et les opérateurs, rappelle les BPH associées et estime l'efficacité des mesures de maîtrise sur le danger et/ou son transfert.

Cette démarche a permis au GT de mettre en évidence les étapes importantes pour la contamination de la viande et l'exposition des opérateurs, regroupées dans un schéma conceptuel (cf. Figure 13).

Tableau 6 : Tableau de maîtrise des *C. botulinum* de types C, D et mosaïques en filière viande bovine

C : cellules végétatives / S : spores / T : toxine ; (-) : « nulle à très faible » ; (+) : « faible à peu élevée » ; (++) : « assez élevée à très élevée » ; O : exposition de l'opérateur ; V : contamination de la viande

Étape		Danger C/S/T/		Causes de contamination (V/O)	Mesures de maîtrise
		Animal restant indemne	Animal en incubation		
Transport	Chargement Trajet Déchargement	Probabilité de présence dans le sang C/S/T (-)	Probabilité de présence dans le sang T (++) C/S (-)	Contamination profonde de la viande - Bactériémie digestive/stress à partir du contenu des estomacs/intestins via le sang (V). La contamination profonde des muscles par des dangers passés dans les torrents circulatoires à partir du TD ne peut être exclue depuis le départ de l'élevage jusqu'à la saignée. Les mesures de maîtrise (MM) vont chercher en prévenir la survenue ou l'amplification	Privilégier les transports « courts » nocturnes (ou « à la fraîche »), conduite souple
	Chargement Trajet Déchargement	Probabilité de présence sur le cuir S (+) C/T (-)	Probabilité de présence sur le cuir : C/S (+) T (-)	Contaminations entre les animaux et par le sol et les parois du camion et des quais de déchargement (V/O) Cuirs souillés (V/O) : il s'agit ici d'une <u>contamination</u> ou d'une <u>sur-contamination</u> des cuirs durant le chargement/trajet/déchargement. Les cuirs constituent alors - une source de contamination superficielle de la viande « mise à nue » à partir du traçage et de la parfente - une source d'exposition professionnelle. Exposition par inoculation, ingestion ou inhalation (O)	Nettoyage régulier après chaque lot et inspection vétérinaire <i>ante mortem</i> : - informations chaîne alimentaire ; - séparation des animaux malades ou blessés ; - séparation des animaux très sales ou mal entretenus ou dangereux ; - animaux morts laissés en attente à l'extérieur avant enlèvement. Concept « d'abattage logistique » en relation avec une grille de propreté par exemple
Stabulation		Probabilité de présence dans le sang C/S/T (-)	Probabilité de présence dans le sang T (++)	Contamination profonde de la viande - si bactériémie digestive/stress à partir du	Locaux de stabulation vastes, calmes, éclairés, pas d'intrusion, pas de « bagarres », « retour au calme » des animaux par mise au repos en stabulation,

Étape	Danger C/S/T/		Causes de contamination (V/O)	Mesures de maîtrise
	Animal restant indemne	Animal en incubation		
		C/S (-)	contenu des estomacs/intestins via le sang (V).	abreuvement obligatoire, affouragement non recommandé. « Mise à l'écart » 24 h possible si jugée nécessaire lors de l'IV <i>ante mortem</i> (animaux excités ou dangereux)
	Probabilité de présence sur le cuir : S (+) C/T (-)	Probabilité de présence sur le cuir : C/S (+) T (-)	Cuirs souillés (V/O) : <u>contamination</u> ou <u>sur-contamination</u> des cuirs (Cf. <i>supra</i> et <i>infra</i>) Exposition par inhalation (O)	Nettoyage régulier après chaque lot et inspection vétérinaire <i>ante mortem</i> : - informations chaîne alimentaire ; - séparation des animaux malades ou blessés ; - séparation des animaux très sales ou mal entretenus ou dangereux ; - animaux morts laissés en attente à l'extérieur avant enlèvement. Concept « d'abattage logistique » en relation avec une grille de propreté par exemple
Amenée/Contention	Probabilité de présence dans le sang C/S/T (-)	Probabilité de présence dans le sang T (++) C/S (-)	Contamination profonde de la viande (V) cf. <i>supra</i>	Voir ci-dessus + avancée régulière (sans stress) des animaux (pente ascendante, pénombre, pas de « bâtons » ...)
	Probabilité de présence sur le cuir : S (+) C/T (-)	Probabilité de présence sur le cuir : C/S (+) T (-)	Contamination externe des cuirs par le couloir d'amenée et le piège (V/O) Exposition par inhalation, ingestion ou inoculation (O)	BPH : individualisation rapide dans le couloir d'amenée, rinçages du couloir fréquents
Insensibilisation par trépanation	Probabilité de présence sur le cuir : S (+) C/T (-)	Probabilité de présence sur le cuir : C/S (+) T (-)	Contamination de la zone de trépanation : par la broche du pistolet qui passe « à travers le cuir » (V) Exposition par inoculation ou inhalation (O)	BPH : nettoyage de l'équipement en fin de tuerie
Sortie du piège - Affalage	Probabilité de présence sur le cuir : S (+) C/T (-)	Probabilité de présence sur le cuir : C/S (+) T (-)	Contamination externe du cuir par tapis ou sol (V)	BPH : rinçage du tapis au jet entre chaque animal

Étape	Danger C/S/T/		Causes de contamination (V/O)	Mesures de maîtrise	
	Animal restant indemne	Animal en incubation			
Saignée / égouttage		Probabilité de présence dans le sang C/S/T (-)	Probabilité de présence dans le sang T (++) C/S (-)	Contamination profonde des muscles par le sang (V)	BPH : élimination massive du sang par section des vaisseaux de gros calibre → animal reposé et rapidement après étourdissement, égouttage suffisamment long (5 min)
		Probabilité de présence sur le cuir : S (+), C/T (-)	Probabilité de présence sur le cuir : C/S (+), T (-)	Contamination superficielle (plaie de saignée) par le couteau « à travers le cuir » (V)	BPH : travail en double matériel 1. Enlèvement d'un « blason » de cuir puis, 2. section des troncs par la zone de saignée dégagée par le blason. Intérêt du concept « d'abattage logistique » en relation avec une grille de propreté par exemple
		Probabilité de présence dans le rumen S (++) , C (+) , /T (-)	Probabilité de présence dans le rumen S/C/T (++)	Contamination superficielle de la zone de saignée par régurgitation lors d'un égorgeage (abattage dérogatoire) (V)	BPH : Poste spécialisé (formation des opérateurs)
		Probabilité de présence dans le sang C/S/T (-)	Probabilité de présence dans le sang T (++) , C/S (-)	Exposition par inoculation ou ingestion (O)	Bonnes pratiques : formations des opérateurs, rinçage mains et avant-bras, tenue (manches longues, poignets fermés) et manipulation des couteaux
Rabotage/Décrotteuse*		Probabilité de présence sur le cuir : S (+) C/T (-)	Probabilité de présence sur le cuir : C/S (+) T (-)	Contamination par inhalation (O)	Protection de l'opérateur par capot sur la décrotteuse, aspiration
Habillage externe	Section	Probabilité de présence sur le cuir : S (+) C/T (-)	Probabilité de présence sur le cuir : C/S (+) T (-)	Contamination externe du cuir entre les animaux par contact (animaux en « grappes ») jusqu'à leur installation sur crochet d'habillage avec intercalaire (V) Contamination localisée lors des sections à travers le cuir (V)	BPH : éviter les « grappes » d'animaux, installation précoce sur crochet d'habillage Pas de section « à travers le cuir »
	Incisions (parfente, traçage)	Probabilité de présence sur le cuir : S (+)	Probabilité de présence sur le cuir : C/S (+) T (-)	Contamination localisée lors de la parfente (V)	BPH : utilisation préalable d'une « décrotteuse » qui diminue les conséquences d'une contamination localisée, à travers le cuir

Étape	Danger C/S/T/		Causes de contamination (V/O)	Mesures de maîtrise
	Animal restant indemne	Animal en incubation		
		C/T (-)		<p>BPH : le cuir de la zone de section est dégagé puis travail en double matériel</p> <p>BPH : nettoyage du matériel, travail en double matériel et technique du « coup de lance » (tranchant du couteau dirigé vers l'opérateur)</p> <p>BPH : formation des opérateurs, travail en double matériel, méthode « main sale/main propre », utilisation de la pesanteur pour « enroutement » du cuir sur lui-même, lavage mains et avant-bras</p>
	Dépouille (voir également traitement du cuir)	<i>Probabilité de présence sur le cuir :</i> S (+) C/T (-)	<i>Probabilité de présence sur le cuir :</i> C/S (+) T (-)	<p>Contamination par la face externe du cuir de la viande (V)</p> <p>Contamination par les particules/débris qui « tombent » du cuir (V)</p> <p>Exposition par inhalation et par inoculation(O)</p> <p>La dépouille doit se faire sans contact des mains des opérateurs avec la viande.</p> <p>La face externe du cuir ne doit pas toucher le muscle/viande.</p> <p>La dépouille mécanique doit être réalisée sans à-coup (du haut vers le bas si possible) pour limiter les projections du cuir vers la viande</p> <p>Cuir évacué rapidement vers secteur sale</p> <p>Ensachage des oreilles possible</p>
Décollation		<i>Probabilité de présence sur le cuir :</i> S (+) C/T (-)	<i>Probabilité de présence sur le cuir :</i> C/S (+) T (-) <i>Probabilité de présence dans les amygdales :</i> C/S/T (+)	<p>Contamination localisée (collier) lors des sections à travers le cuir (V)</p> <p>Contamination localisée lors de la parfente (V)</p> <p>Exposition par inoculation ou ingestion (O)</p> <p>Contamination par le cuir des oreilles si contact avec la carcasse (V)</p> <p>BPH : le cuir de la zone de section est dégagé puis travail en double matériel</p> <p>BPH : nettoyage du matériel travail en double matériel</p> <p>Oreilles enlevées avec la tête ou « ensachage » des oreilles</p> <p>Formation des opérateurs à l'enlèvement de la langue</p>

Étape		Danger C/S/T/		Causes de contamination (V/O)	Mesures de maîtrise
		Animal restant indemne	Animal en incubation		
				Contamination de l'opérateur (O) et de la langue (V) par effraction des amygdales lors de l'enlèvement de la langue Exposition par inoculation ou ingestion (O)	
Habillage interne	Détourage et ligature du rectum	<i>Probabilité de présence dans le TD (rectum)</i> S(++) C(+) T(-)	<i>Probabilité de présence dans le TD (rectum)</i> C/S/T (++)	Contamination : risque d'écoulement lorsque le rectum ensaché est replacé à l'intérieur de la cavité abdominale (V) Exposition par inoculation ou ingestion (O)	BPH : formation de l'opérateur, intégrité des matériels, travail en double matériel, solidité de la ligature
	Ouverture de la cavité abdominale	Idem ci-dessus	Idem ci-dessus	Contamination par la scie et les organes (V) Exposition par inoculation ou ingestion (O)	BPH : respect des angles de coupe pour ne pas atteindre les organes, <u>formation des opérateurs</u> pointe du couteau dirigée vers l'opérateur, utilisation de « stérilisateur eau chaude » pour les scies et les couteaux, utilisation de matériel spécialisé
	Éviscération abdominale : (voir également traitement du 5 ^{ème} quartier)	Idem ci-dessus	Idem ci-dessus	Contaminations de la paroi abdominale par éviscération tardive (V) Contamination par percement du tube digestif (V) Contaminations par écoulement du contenu du tube digestif (V) Contamination par le matériel et l'opérateur (V)	BPH : l'éviscération abdominale doit intervenir dans les 45 min suivant l'étourdissement ou 30 min en dérogatoire BPH : formation des opérateurs, pointe du couteau dirigée vers l'opérateur, méthode « main sale/main propre », saisir en premier le rectum ensaché, évacuation des masses digestives vers secteur sale BPH : Ligature de l'œsophage, détourage et ligature de l'anus BPH : formation, pas de contact avec la viande, lavage fréquent des mains et avant-bras et du matériel

Étape	Danger C/S/T/		Causes de contamination (V/O)	Mesures de maîtrise	
	Animal restant indemne	Animal en incubation			
			Exposition par inoculation ou ingestion (O)		
Éviscération thoracique (voir également traitement des abats rouges) + Foie et rognons	<i>Probabilité de présence dans les poumons et abats</i> C/S/T (-)	<i>Probabilité de présence dans le foie et les rognons</i> T (+ à ++)/C (+) / S (-)	Contamination foie et rognons (V) Contamination lors de la manipulation des foies (O) (inoculation ou ingestion)	BPH : formation, pas de contact avec les abats, lavage fréquent des mains et avant-bras et du matériel. Réfrigération rapide (<+3 °C) Bonnes pratiques d'inspection	
<i>À partir de ce stade, possibilité de transfert de contamination via le matériel, l'air, les opérateurs et les carcasses</i>					
Fente en demi :		C/S/T (-)	C/S/T (-)	Contamination par la lame de la scie (V)	BPH : utilisation systématique des « stérilisateurs » à eau chaude entre chaque carcasse, conception hygiénique des matériels, N&D poussée de la scie en fin de tuerie
Aspiration		C/S/T (-)	C/S/T (-)	Contaminations par l'opérateur et le matériel (V).	BPH : formation, pas de contact avec la viande, lavage fréquent des mains et avant-bras et du matériel
Émoussage	Le transfert de contamination requiert une contamination préalable des carcasses	C/S/T (-)	C/S/T (-)	Contamination par le couteau Whizard (V) :si contamination superficielle de la zone émoussée de la carcasse « n » et absence de rinçage du matériel contaminé avant l'émoussage de la carcasse « n+1 »	BPH : formation (enlèvement des graisses sans entamer le muscle), nettoyage régulier du Whizard, double matériel
Pesée classification traçabilité	Le transfert de contamination requiert une contamination préalable des carcasses	C/S/T (-)	C/S/T (-)	Contamination entre carcasse par grille d'exposition de la machine à classer (V)	N/D de la grille en fin de tuerie – Faibles surfaces de contact

Étape		Danger C/S/T/		Causes de contamination (V/O)	Mesures de maîtrise
		Animal restant indemne	Animal en incubation		
Ressuage réfrigération	/ Le transfert de contamination requiert une contamination préalable des carcasses	C/S/T (-)	C/S/T (-)	Contaminations entre les carcasses (V) Contaminations par sol et parois (V)	BPH : pas de contact entre les carcasses. N&D en absence de carcasses
Cas du traitement du 5^{ème} quartier et exposition professionnelle					
Issues	Traitement des cuirs	<i>Probabilité de présence sur le cuir :</i> S (+) C/T (-)	<i>Probabilité de présence sur le cuir :</i> C/S (+) T (-)	Exposition par inhalation (O)	BPH extraction de l'air travail cuirs mouillés
	Traitement des masses digestives	<i>Probabilité de présence dans le TD (rectum)</i> S(++) C(+) T(-)	<i>Probabilité de présence dans le TD (rectum)</i> C/S/T (++)	Exposition par inoculation ou ingestion (O)	BPH : limiter les contacts, transferts rapides vers les machines de traitement, lavage fréquent des mains et des avant-bras
Abats	Parage des foies	<i>Probabilité de présence dans le foie</i> C/S/T (-)	<i>Probabilité de présence dans le foie</i> T (+ à ++)/C (+) / S (-)	Exposition par inoculation ou ingestion (O)	BPH : formation des opérateurs, lavage fréquent des mains et des avant-bras.

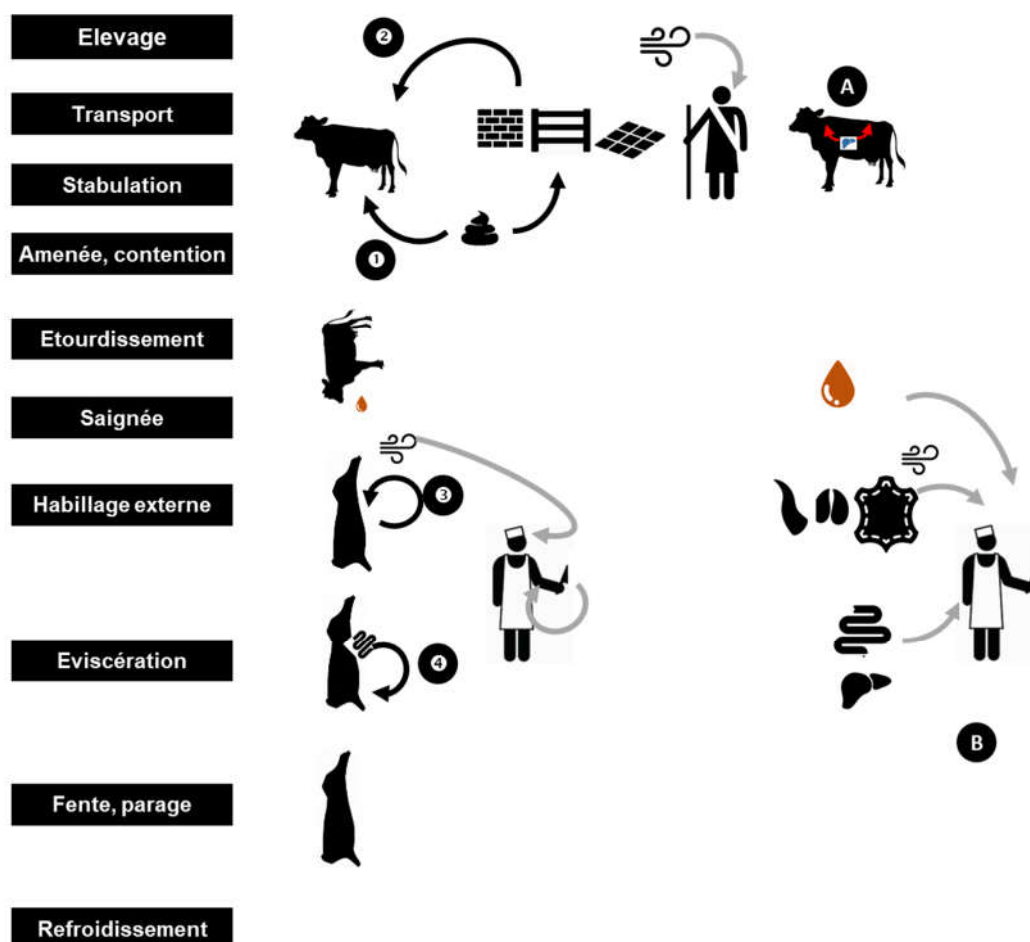


Figure 13 : Principales sources et voies de contamination de la viande (flèches noires) et d'exposition des opérateurs (flèches grises) du transport à l'abattage ;

Les lettres et numéros correspondent aux sources et étapes clés de contamination identifiées par le GT ; A : bactériémie digestive au cours du transport ; 1 : cuirs souillés par les matières fécales 2 : contamination des cuirs par le sol et les parois du camion et des quais de déchargement ; 3 : contamination superficielle de la viande par le cuir ; 4 : contamination par le contenu du tube digestif ; B : sources d'exposition professionnelle lors du traitement du 5^e quartier : abats, cuirs, peaux, sang, etc.

En conclusion, le GT a considéré que la contamination des viandes dans la séquence transport-abattage ne pouvait être totalement déconnectée des conditions de contamination des animaux à la ferme.

- Ainsi, **de la ferme à l'abattoir**, en plus des bonnes pratiques d'élevage (cf. partie élevage), les points clés de la maîtrise sont : (i) la surveillance de l'état de santé des animaux et le diagnostic vétérinaire précoce et (ii) la propreté des animaux. Actuellement, le diagnostic à la ferme intervient dans une phase tardive permettant toutefois d'empêcher l'abattage d'animaux présentant des signes cliniques. Il est à noter que l'inspection vétérinaire *ante mortem* à l'abattoir peut permettre de repérer ces signes confirmant l'importance de sa bonne réalisation, mais des animaux porteurs asymptomatiques (indétectables) peuvent se présenter à l'abattoir.

Dans ce contexte, le transfert du danger aux muscles via le torrent circulatoire peut se faire suite à l'altération de la paroi intestinale causée notamment par le stress occasionné par le transport vers l'abattoir. Il est à noter que les mesures de maîtrise à l'abattoir ont peu d'impact sur une contamination profonde des muscles ayant eu lieu avant la séquence transport-abattage.

De même, la propreté générale des animaux, du cuir et des phanères influence sur le transfert du danger. Cette propreté dépend des conditions d'hébergement et d'entretien des locaux au sein de l'élevage, qui pourraient faire l'objet d'actions d'amélioration au moins dans les jours précédant le

départ des animaux. Un transport individualisé d'un animal mal entretenu éviterait les transferts de contamination entre animaux dans un lot mais déplacerait le problème à l'abattoir. La mise à jeun d'au moins 24 heures diminue le volume fécal et donc l'excrétion.

- **De la stabulation à la chambre froide** : il apparaît que les bonnes pratiques d'abattage et les BPH au sens large sont suffisantes pour maîtriser le transfert du danger à la viande, à la condition expresse de leur mise en œuvre effective et constante. À ce titre, le GT ne peut que recommander toute démarche de management de l'hygiène permettant d'attester de cette mise en œuvre, comme les BPHs (bonnes pratiques d'hygiène surveillées) par exemple. Le GT souhaite néanmoins attirer l'attention sur certains points qui méritent une vigilance accrue pour ces animaux issus d'un élevage où des signes cliniques ont été détectés/confirmés :
 - l'inspection vétérinaire *ante mortem* qui doit inclure l'examen de signes cliniques pouvant évoquer le botulisme ;
 - la propreté des animaux, qui devrait être estimée de façon objective (e.g. par une grille de propreté), et entraîner l'abattage en fin de tuerie des animaux jugés « sales » ;
 - la manipulation des foies et des réservoirs digestifs devrait être limitée et la valorisation alimentaire de ces abats exclue.
- Toutes les possibilités d'**exposition professionnelle** sont présentées, même si leur survenue est **hautement improbable**. En effet, le contexte épidémiologique se traduit par l'absence de cas rapporté de botulisme en milieu professionnel tant en élevage qu'à l'abattoir. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la présence à l'abattoir de ce type d'animaux est peu fréquente, et /ou que les bonnes pratiques d'hygiène sont suffisantes pour limiter l'exposition des opérateurs.
 - Botulisme par inoculation

Toute manipulation d'objet coupant peut être considérée comme une voie potentielle d'exposition par inoculation à la suite d'une blessure ou d'une coupure avec un objet possiblement contaminé avec des spores, des cellules végétatives ou des toxines. Les mesures de protection appliquées à l'abattoir permettent de limiter/maîtriser le risque de botulisme par coupure.
 - Botulisme par inhalation

La nécessité que des toxines soient présentes en grande quantité au niveau des muqueuses nasales des travailleurs en abattoir rend très improbable un botulisme par inhalation. L'inhalation seule de spores ne causera pas cette forme de botulisme. Les conditions d'anaérobiose nécessaires à la germination et à la production de toxine ne sont présentes dans les voies respiratoires. À la suite de l'inhalation de spores, il peut y avoir remontée mucociliaire puis déglutition de celles-ci. Seul un botulisme infectieux de l'adulte pourrait être envisagé par ce mécanisme. Les conditions médicales prédisposant à un botulisme infectieux de l'adulte sont incompatibles avec le travail à l'abattoir.
 - Botulisme suite à l'ingestion de toxines (manuportées)

Les toxines provenant d'un animal en incubation pourraient être ingérées par les opérateurs par l'intermédiaire de mains souillées. L'application des BPH (le lavage des mains en particulier) permet de maîtriser ce risque.

3.4 Transformation

Conformément aux principales conclusions de la séquence transport-abattage, seules seront considérées la possibilité d'une contamination en surface des carcasses à l'abattoir par des spores et la présence de toxine dans les foies issus d'animaux en incubation. La contamination profonde *ante*

mortem par des spores (bactériémie) ne peut être exclue mais si elle intervient, il s'agit d'un événement particulièrement rare.

En effet, l'analyse des données disponibles fait état de l'accumulation de toxine dans la viande chez des animaux exprimant des signes cliniques. Ceux-ci sont de toute façon écartés de la chaîne alimentaire, car détectés en élevage ou pour ceux en incubation tardive, lors de l'inspection *ante mortem*. Dans l'éventualité où ce type d'animaux se présente à l'abattage, avant l'apparition des signes cliniques, il est mentionné qu'une localisation sanguine de la toxine ne peut être exclue dans cette situation. Cependant, compte tenu de la présence de l'étape de saignée, la concentration de toxine dans le muscle serait résiduelle en quantité et ce phénomène représente de surcroît une situation dont l'occurrence serait extrêmement faible. L'évolution *post mortem* du muscle, appelée transformation du muscle en viande, met en œuvre toute une série de processus enzymatiques (protéases d'origine lysosomiale essentiellement) qui pourraient être de nature à contribuer à l'inactivation ou à la réduction de l'activité des toxines botuliques résiduelles le cas échéant.

3.4.1 Découpe/désossage

Nota bene/Avertissement : pour les ateliers de découpe, la diversité des organisations et des équipements est importante. La description se limitera aux grands principes de fonctionnement dans une représentation « standard » mais non idéalisée, ainsi qu'aux principales possibilités de transferts de contamination.

Comme vu précédemment, les héli-carasses sont l'un des produits obtenus par la 1^{re} transformation d'un animal de boucherie (abattage). Le devenir de ces produits se joue dans les locaux de 2^e transformation appelés le plus souvent ateliers de découpe/désossage. En France, en filière bovine, le désossage à chaud n'est pas très répandu et ce sont des carcasses froides, plus ou moins maturées, qui sont progressivement découpées/désossées au fur et à mesure de leur passage aux différents postes des ateliers. Ces derniers sont des établissements agréés constituant des établissements à part entière qui peuvent, selon les cas, être intégrés à un établissement de 1^{re} transformation ou totalement séparés. Comme pour les abattoirs, ces ateliers dans leur conception et fonctionnement respectent 3 grands principes :

- le principe de Schwarz (marche en avant) ;
- la sectorisation (ou zonage, avec généralement deux secteurs) ;
- le non entrecroisement des circuits propre et sale.

Par surcroît, ces ateliers mettent en œuvre un quatrième grand principe : la chaîne du froid. Les pièces de viande sont traitées dans des locaux dont la température est inférieure à 10 °C et dans lesquels il règne une certaine maîtrise des flux d'air (température, circulation du haut vers le bas et, éventuellement, action possible sur son humidité relative). Cette maîtrise de la chaîne du froid et la rapidité des opérations effectuées en conditions aérobies sur des héli-carasses réfrigérées constituent les principales mesures pour éviter la germination des spores et la toxigenèse. Plus généralement, la maîtrise de l'hygiène des opérations est classique, s'appuyant, au-delà des grands principes énoncés, sur des bonnes pratiques d'hygiène et un plan HACCP.

Les modes de découpe sont divers et par conséquent les produits de l'activité de découpe/désossage le sont également, le « marché » dictant aussi l'activité de ces ateliers où sont retrouvés des muscles ou groupes de muscles, des morceaux avec os et d'autres affranchis¹⁷ pouvant servir dans la fabrication de viande hachée par exemple. Les muscles sont libérés de leur attache anatomique et passent, pour

¹⁷ Affranchis : ce sont des morceaux de muscles squelettiques, aptes à la consommation humaine, avec leurs tissus graisseux et conjonctifs résiduels obtenus après parage.

les morceaux les plus « nobles », à la peulseuse (épluchage) pour enlever l'aponévrose. Le plus fréquemment, la découpe se fait en « horizontal » sur tables de découpe (Figure 14).

Les carcasses vont donner 4 quartiers :

- 2 arrières avec (découpe pistola) ou sans (découpe à la parisienne) flanchet et,
- 2 avant (caparaçon, poitrine, plat de côtes, raquette, colliers).

Les quartiers arrivent sur des rails en salle de découpe, ces grosses pièces sont prédécoupées en vertical puis « affalées » sur les premières tables de découpe/désossage. L'une des organisations les plus répandues est schématisée ci-dessous (Figure 14).

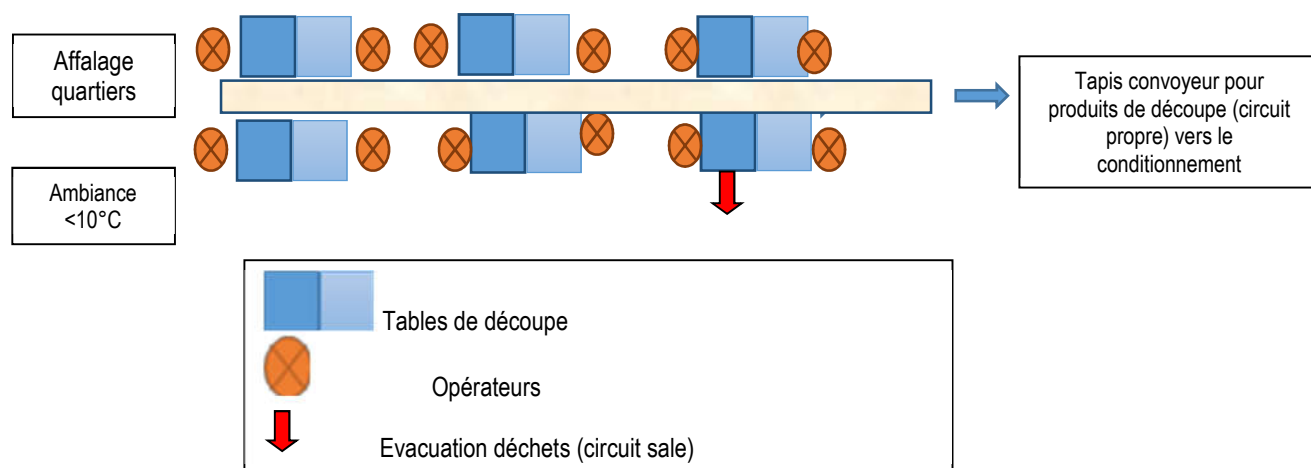


Figure 14 : Représentation schématique d'un atelier de découpe

Selon le quartier affalé, les coupes produites arrivent sur le tapis central pour, dans le cas des muscles « nobles » (viande des grisons pour le GT), les opérations finales d'épluchage (élimination des « nerfs » et aponévroses) et de mise sous vide (cryovac). Les affranchis sont récupérés et les déchets sont évacués. Il s'agit d'un procédé de courte durée ne dépassant pas 1 heure entre l'affalage des quartiers et la mise sous vide des muscles épluchés (ou le transfert en bac du minéral).

La source du danger étant représentée par la contamination de surface des quartiers affalés, il va s'agir principalement de transferts indirects (depuis les tables de découpe, opérateurs, couteaux) entre carcasses. Les BPH et mesures de maîtrise ne sont pas fondamentalement différentes de celles de l'abattoir (travail en double couteau, équipements de protection individuelle, hygiène des mains et des avant-bras), mais elles sont adaptées à l'activité, notamment le nettoyage et désinfection des surfaces de découpe en polypropylène qui doivent être « raclées » et changées régulièrement en cours de journée de production. L'éplucheuse doit également faire l'objet d'une vigilance accrue car elle va généralement recevoir et traiter les produits de plusieurs postes. Son nettoyage et sa désinfection, approfondis, nécessitent son démontage. Son statut est particulier car il s'agit potentiellement d'un vecteur de transfert de contamination mais son action (épluchage) participe à la diminution de la contamination de surface, puisque la surface contaminée est enlevée.

En conclusion, la conception hygiénique des ateliers et des équipements utilisés, ainsi que l'organisation des activités de découpe sur la base de bonnes pratiques hygiéniques et de démarche HACCP sont de nature à maîtriser les transferts des spores éventuellement présentes, leur germination, croissance ainsi que la production de toxines. La mise en place de toute démarche planifiée permettant d'attester de cette bonne organisation ne peut qu'être recommandée (surveillance des bonnes pratiques, surveillance microbiologique de l'environnement de production...).

Le GT souhaite porter l'attention sur certains points de vigilance, voire points d'attention :

- la chaîne du froid ;
- les couteaux (travail en double matériel) et l'utilisation des stérilisateurs à couteau à chaque poste ;
- le nettoyage et la désinfection soignée de l'éplucheuse ;
- l'entretien (nettoyage et désinfection et raclage) des surfaces de découpe, et leur changement régulier.

3.4.2 Troisième transformation

Les possibilités de croissance et de toxigenèse de *C. botulinum* du groupe III sont évaluées au cours de la transformation de trois produits carnés bovins : viande hachée, salaison sèche (type viande des grisons), terrine de foie.

Cette sélection permet d'illustrer l'impact de différents procédés de transformation et de mesures de maîtrise sur *C. botulinum* : maîtrise de la chaîne du froid, séchage, ajout de sel et de conservateurs, traitement thermique, durée de vie.

3.4.2.1 Viande hachée

Les viandes hachées sont les viandes désossées qui ont été soumises à une opération de hachage en fragments et contenant moins de 1 % de sel (l'ajout de sel est interdit si mention 100 % bœuf). Le hachage peut se faire dans les boucheries (« à la demande » et à la vue du client) mais surtout dans des établissements spécialisés pour la filière industrielle. Ces ateliers sont des établissements agréés avec un mode de conception et de fonctionnement proches d'un atelier de découpe, respectant les mêmes quatre principes.

Pour la viande hachée, c'est souvent, mais pas uniquement, la viande du caparaçon qui est utilisée. Les morceaux de viande destinés à la fabrication des viandes hachées (muscles et affranchis) constituent les viandes pour haché (VPH, anciennement appelée « minerai »). Une unité de VPH est constituée de morceaux de viande choisis dont la composition dépend du taux de matière grasse souhaité (5 %, 15 % ou 20 %) et du rapport collagène/protéines. Les morceaux proviennent de plusieurs carcasses. Les mêlées sont fabriquées à partir de plusieurs unités de VPH (entre une et cinq en filière réfrigérée).

Les délais maximaux de conservation des viandes après abattage pour la fabrication des viandes hachées bovines sont de six jours pour les viandes réfrigérées et 15 jours pour les viandes désossées et emballées sous vide (Règlement (CE) n° 853/2004). Pour les viandes hachées réfrigérées, les VPH issues du désossage et de la découpe sont conservées dans des chambres froides (entre 0 et 1 °C) durant un à deux jours avant d'être utilisées. Les viandes hachées surgelées peuvent être fabriquées à partir de VPH réfrigérées ou congelées avec un ratio réfrigéré/congelé variable selon la disponibilité des viandes et la cadence des fabrications.

Le hachage va se faire sous le régime du froid (machines à 3 °C). À la suite du hachage a lieu l'étape de grammage qui va donner la forme et le poids au steak (125 g généralement), avant le conditionnement et la réfrigération (filière VH réfrigérée) ou la surgélation (filière VH surgelée).

Si l'on admet que la principale source du danger est constituée par les spores en surface de la viande, le processus mis en œuvre va, à la fois, répartir cette contamination dans la mêlée et la diluer dans un volume plus important (entre 600 kg et 1500 kg en surgelé) ; le hachoir est un équipement concourant au transfert de dangers entre deux mêlées.

La maîtrise de la chaîne du froid exclut toute possibilité de toxigenèse dans la viande hachée.

Les points clés de maîtrise sont :

- la qualité hygiénique des matières premières qui ne doivent provenir que d'abattoirs agréés ;
- le respect de la chaîne du froid ;
- le nettoyage et la désinfection du hachoir.

3.4.2.2 Salaison sèche de bœuf – type viande des grisons

La viande des grisons est un produit de salaison cru et séché. Il est fabriqué à base de muscles d'animaux de l'espèce bovine. Il s'agit de pièces de muscles du globe auxquels la transformation confère une forme parallélépipédique, une texture ferme et une couleur rouge à rouge foncé selon le degré de sèche. La viande des grisons fait partie des produits présentant des taux de sel de l'ordre de 3 % dans le produit fini (valeur atteinte en 72 h) et qui ont perdu 50 % du poids initial de la viande qui a servi à les fabriquer (Deumier 2000).

Le diagramme de fabrication peut être résumé aisément : une fois le choix des morceaux effectué, les muscles sont recouverts d'un mélange salant contenant essentiellement du sel, additionné souvent de salpêtre et d'ingrédients divers (épices, aromates, sucre, etc.) au gré des recettes. Les morceaux de viande sont frottés avec ce mélange salant puis pressés ensemble pendant des durées allant de cinq jours (procédé industriel rapide) à cinq semaines (procédé traditionnel).

Le salage peut également s'effectuer par injections multi-aiguilles d'une saumure. Durant cette opération, il faut veiller à enlever régulièrement les exsudats et retourner les pièces. Les durées de salage sont fonction de différentes recettes et cahiers des charges, de même la température à l'intérieur du saloir. En France, la description du procédé dans le code des usages ou d'autres ouvrages indique, après un étuvage court, un stationnement en saloir à +8 °C de deux à quatre semaines selon la grosseur des morceaux (Migaud et Frenzt 1978). Dans tous les cas, les morceaux sont pressés et retournés une fois par jour durant toute la durée de salage.

Les dynamiques d'évolution de l'activité de l'eau dans des matrices similaires (cecina, biltong) est présentée en figure 15. Les modèles de microbiologie prévisionnelle prédisent l'interface de croissance/non croissance de *C. botulinum* de type II qui présente les mêmes caractéristiques de valeurs cardinales pour le pH et l'activité de l'eau mais une meilleure adaptation à la température que les souches de type C/D. Même pour des conditions de température au cours du salage les plus propices à la croissance (T=10 °C, pH = 6, sans utilisation de lactate ou de nitrite) la croissance n'est pas possible notamment grâce à l'action combinée de la température et de l'activité de l'eau (et du % de sel associé).

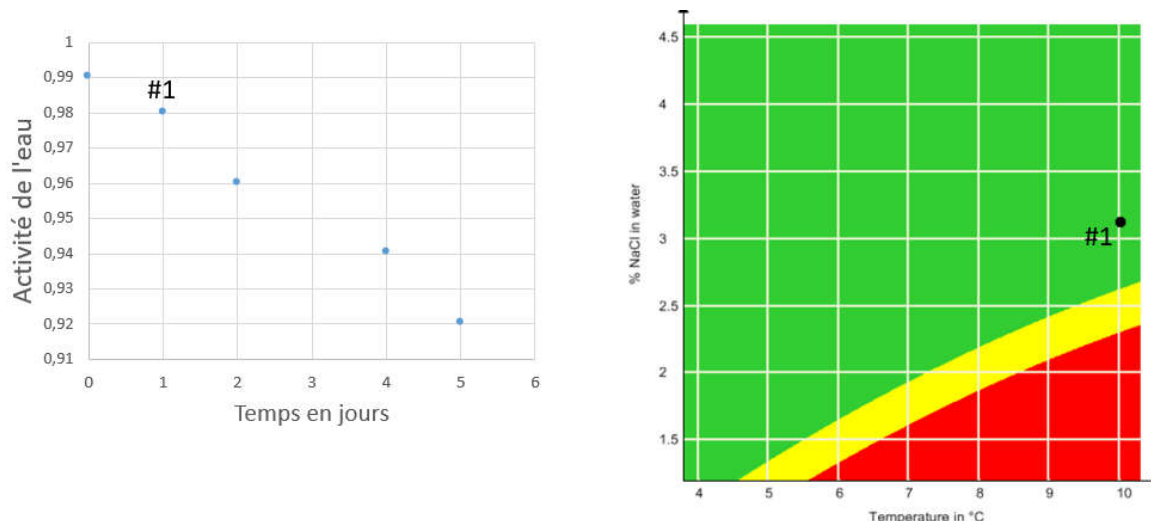


Figure 15 : (a) Cinétique d'évolution de l'activité de l'eau au cours des premières phases de fabrication (cinétique inspirée de Lorenzo (2014) et Karolenko *et al.* (2020)) (b) Probabilité de croissance de *Clostridium botulinum* d'après le Danish Meat Research Institute (DMRI)

(la zone verte est caractérisée par une probabilité de croissance <0,00025).

À l'issue du salage, les pièces sont préparées au séchage, c'est-à-dire rincées et raidies par la baisse de température. Le séchage peut se faire à l'air en séchoir (procédé rapide) ou local de type hâloir, à une température comprise entre 12 et 15 °C (Migaud et Frentz 1978). En fin de séchage (4 semaines généralement), le produit a perdu 50 % de son poids, présente une a_w de 0,92 environ. Avant son conditionnement tranché ou non, le produit doit généralement subir un PPDA (parage pour défaut d'aspect) : élimination de la fleur.

Considérant le danger présent sous la forme de spores en surface des pièces musculaires salées et séchées, leur persistance au décours du procédé (5 à 10 semaines) est plausible. Les points clés de maîtrise cités ci-dessus (choix des pièces musculaires) sont tout de même de nature à limiter la contamination initiale en spores.

S'agissant des possibilités de croissance et de toxigenèse, les quelques données disponibles suggèrent une croissance des souches de *C. botulinum* du groupe III à partir de 15,6 °C et l'absence de croissance pour des concentrations en sel au-delà de 3 %, a_w inférieure à 0,97 et pour des valeurs de pH inférieures ou égales à 4,9 (cf. section 2.4.1).

Le pH du produit n'est pas suffisamment inhibiteur, se situant en fin de procédé aux alentours de 5 à 5,2 par le développement de flores compétitrices de *C. botulinum*. Comme vu ci-dessus, la température durant les longues périodes de salage et de séchage, précisée et maîtrisée (+8 °C puis 12 à 15 °C pour le séchage), est incompatible avec la croissance et la toxigenèse, *a fortiori* par la contribution des autres facteurs, notamment la concentration en sel à la surface des pièces musculaires durant le salage (supérieure à 3 %), la présence de nitrites et la baisse de l' a_w durant le séchage.

Sur le produit fini dont la conservation peut se faire dans le bac à légumes du réfrigérateur, la faible a_w , la présence de sel et de nitrites, l'acidification (pH ~ 5) par le développement de microorganismes lactique et fongique, sont des éléments ne permettant pas la toxigenèse au cours de la conservation du produit.

Les points clés de maîtrise sont :

- le choix des pièces musculaires. Il s'agit de morceaux choisis généralement en profondeur, près de l'os, dont la contamination de surface sera limitée. L'usage de viandes surmenées (pH > 6) pour cette fabrication n'étant pas autorisée, la mesure du pH peut constituer un contrôle qualité à réception des matières premières. Un pH ultime normal (5,6) est un signe d'absence de stress d'abattage chez l'animal ;
- l'utilisation de salpêtre dans le mélange salant ;
- le développement d'un microbiote halophile pendant le salage ;
- le stationnement des produits à des températures inférieures à 15 °C en France ;
- un séchage permettant d'amener l' a_w à une valeur comprise entre 0,9 et 0,92 avant le conditionnement.

3.4.2.3 Terrine de foie

Ce troisième exemple de produit a été choisi parce qu'il comporte une matière première « à risque » et un traitement thermique. Les terrines de foie sont des préparations mélangeant par un hachage grossier différents maigres, du gras de porc, des épices, des aromates, des additifs (salpêtre ou sel nitrité) et du foie de bœuf (20 % minimum). Les quatre scénarios de cuisson choisis pour cet exemple aboutissent à un produit pasteurisé qui devra se conserver au froid ayant subi :

- une valeur pasteurisatrice (VP) de 100, équivalent à 100 minutes à la température de référence de 70 °C (ou 10 min / 80 °C, 1 min/90°C) (scénario 1) ;

- une valeur pasteurisatrice (VP) de 200, équivalent à 200 minutes à la température de référence de 70 °C (ou 20 min / 80 °C, 2 min/90 °C) (scénario 2) ;
- une VP de 1 000 équivalent à 1 000 minutes à la température de référence de 70 °C (ou 100 min/80 °C, 10 min / 90 °C) (scénario 2 sécuritaire) ;
- une VP de 3 000 équivalent à 3 000 minutes à la température de référence de 70 °C (ou 300 min / 80 °C, 30 min/90 °C) (scénario 3 plus sécuritaire).

La source du danger est le foie de bœuf provenant d'un animal en incubation. La probabilité de présence du danger a été estimée comme « nulle à très faible » pour des spores, « faible à peu élevée » pour des cellules végétatives, et « assez élevée à très élevée » pour la toxine (cf. section 3.2).

Les profils de cuisson choisis porteront la température à cœur du produit à plus de 80 °C.

Les valeurs de référence de D figurent dans le tableau 3. Les bonnes pratiques hygiéniques et de fabrication sont considérées appliquées dans l'établissement et qu'il n'y a pas d'amplification du danger dans le foie.

Tableau 7 : Impact des quatre scénarios de cuisson de la terrine de foie sur les différentes formes de *C. botulinum* du groupe III

	Spores* de <i>C. botulinum</i> du groupe III	Cellules** de <i>C. botulinum</i> du groupe III	Toxine*** botulique types C, D	DLC**** du produit à +3 °C
VP 100	Pas d'effet	> 6 D	Inactivation partielle	21 jours
VP 200	Pas d'effet	> 6 D	Inactivation totale (non détectable)	21 à 28 jours
VP 1 000	1 D	> 6 D	Inactivation totale (non détectable)	< à 42 jours
VP 3 000	3 D	> 6 D	Inactivation totale (non détectable)	42 jours

*Probabilité de présence dans le foie nulle à très faible **probabilité de présence dans le foie faible à peu élevée. Il est convenu en microbiologie des aliments (recherche et dénombrement de spores) qu'un chauffage de 10 min à 80 °C élimine toutes les cellules végétatives. *** probabilité de présence dans le foie d'un animal en incubation élevée. **** Exemples de DLC (sous la responsabilité de l'exploitant).

Les traitements thermiques modérés n'auront que peu d'effet sur les spores de *C. botulinum* de types C et D dont la probabilité de présence dans le foie a été estimée comme nulle à très faible (Tableau 7 : Impact des quatre scénarios de cuisson de la terrine de foie sur les différentes formes de *C. botulinum* du groupe III Tableau 7). Les cellules végétatives ne poseront pas de problème particulier quelle que soit la VP choisie. La thermorésistance des toxines botuliques pourrait éventuellement poser un problème de sécurité pour la VP 100, les autres VP étant plus sécuritaires de ce point de vue.

Compte tenu de la température minimale de croissance des *C. botulinum* du groupe III, les conditions normales de conservation ne permettent ni la croissance ni la toxinogénèse au cours de la durée de vie de ces produits.

Les points clés de maîtrise sont :

- la chaîne du froid pour les matières premières (foie). Réglementairement, les abats rouges doivent atteindre moins de 3 °C, 24 h après la mort de l'animal. Le maintien de la chaîne du froid est capital pour ce type de produit ;
- le refroidissement après la cuisson doit être rapide. Il est à noter que le calcul de la VP tient compte à la fois de la montée en température, du plateau de cuisson et du refroidissement ; une VP permettant d'atteindre à cœur du produit la température de 90 °C pendant 2 minutes, si compatible avec la recette.

4 Maîtrise des *C. botulinum* de types C, D et mosaïques en filière laitière bovine

Conformément à la réglementation européenne, le lait cru doit provenir d'animaux en bonne santé, ne présentant aucun symptôme de maladie transmissible à l'Homme par le lait ou pouvant entraîner la contamination du lait. Aussi, le lait d'une vache présentant des signes cliniques donnant lieu à suspicion de botulisme doit être collecté séparément et ne peut être mélangé dans le tank avec le lait du reste du troupeau. Dans ces conditions, seul le cas des animaux sans signes cliniques apparents dont le lait a été collecté avant le signalement du cas index et la mise en place de l'APMS a été considéré. Il peut s'agir d'animaux indemnes, en incubation ou atteints de formes frustes.

Les mesures de gestion actuellement appliquées dépendent de la destination du lait (alimentation infantile ou autre filière), du niveau d'hygiène de l'élevage, et incluent un traitement thermique (pasteurisation ou stérilisation) et un retrait/rappel des produits le cas échéant. Une question de la saisine porte sur l'efficacité des traitements du lait (pasteurisation, traitement UHT, bactofugation, filtration membranaire). Par ailleurs au cours de leur audition, les représentants de la DGAL ont fait part de leur questionnement sur la poudre de lactosérum, utilisée en tant qu'ingrédient dans les produits laitiers infantiles.

Aussi, les produits laitiers considérés par le GT sont les suivants : lait (pasteurisé, stérilisé, microfiltré), poudre de lait (incluant la poudre de lactosérum).

Le lait cru destiné à être consommé en l'état et les fromages au lait cru ont été considérés par le GT et, après analyse, ont été exclus du périmètre de l'expertise au regard des données épidémiologiques et des résultats d'expertises antérieures de l'Agence :

- Le danger *C. botulinum* n'a pas été mentionné parmi les différents dangers transmissibles par le lait cru à consommer en l'état (Afssa 2008; Anses 2015; EFSA Panel on Biological Hazards 2015). En effet, les températures de conservation et la durée de vie du lait cru à consommer en l'état ne permettent pas la germination des spores ni la croissance des cellules végétatives.
- La synthèse des épidémies réalisée par le GT socle n'a pas identifié le lait cru comme véhicule d'une épidémie.
- Les fromages au lait cru n'ont pas été identifiés comme des aliments pertinents vis-à-vis de *C. botulinum* (Anses 2021b).

Par la suite, les possibilités de contamination, de croissance et de toxinogénèse depuis l'élevage (traite et collecte) jusqu'à la consommation ont été examinées et l'efficacité des mesures de prévention et de maîtrise existantes pour le danger ont été évaluées.

4.1 Élevage de production laitière

4.1.1 Causes de contamination du lait par les matières fécales

Comme vu précédemment, la contamination du lait par *C. botulinum* sous ses différentes formes n'est envisageable que par voie exogène. En, effet, la contamination du lait de vache *in situ* et du tissu mammaire n'est pas décrite, tant chez les individus malades que chez ceux ne présentant pas de signes cliniques au sein d'un élevage connaissant ou ayant connu un épisode clinique (Bano 2018, 2019). Seules deux publications d'une même équipe (Böhnelt, Neufeld et Gessler 2005; Böhnelt et Gessler 2013) font état de la détection de *C. botulinum* et/ou de toxine botulique dans le lait et le tissu mammaire chez des vaches atteintes de botulisme ou de ce que les auteurs ont dénommé « botulisme viscéral ».

Dans la continuité du rapport du GT socle, et comme d'autres équipes l'ont fait dans diverses publications, les experts ont décidé de ne pas en retenir les conclusions.

Lors de la survenue d'un épisode botulique dans un élevage bovin laitier, la contamination du lait est susceptible de se produire lors des opérations de traite et conduit à rappeler l'importance de la régie d'élevage, de l'hygiène générale des bâtiments d'exploitation, des animaux et de leurs logements, ainsi que de l'hygiène de la traite et des matériels qui lui sont dédiés.

La traite est donc la circonstance majeure au cours de laquelle le lait est susceptible d'être contaminé par *C. botulinum* sous ses différentes formes. Les sources de contamination du lait sont essentiellement représentées par les matières fécales, contenant potentiellement des spores de *C. botulinum*, des vaches en production. Ce portage fécal est susceptible d'être plus ou moins important suivant le statut de l'animal vis-à-vis de la maladie : en incubation, contaminé sans signes cliniques, malade présentant des signes cliniques frustes non détectés, convalescent, guéri, resté indemne (en relation avec une contamination trop faible), non contaminé (cf. 3.2).

Les quelques travaux sur ce point établissent un niveau de portage inférieur à 4 spores par gramme de fèces de *C. botulinum* de type B (évaluation par méthode statistique) chez les vaches dans des troupeaux sans historique de botulisme (Dahlenborg, Borch et Rådström 2003). En ce qui concerne les différents types de *Clostridium botulinum* étudiés dans cette saisine, d'autres études plus récentes en Italie et en France indiquent, sans le quantifier, qu'un portage digestif peut être parfois détecté chez d'autres animaux que ceux qui expriment des signes cliniques classiques de la maladie :

- chez un des deux bovins analysés et présentant des signes cliniques frustes, seules formes présentes au sein d'un cheptel atteint de botulisme de type D/C ayant évolué sur plusieurs mois (LNR 2020) ;
- chez des bovins guéris ou convalescents, au sein de cheptels connaissant ou ayant connu un épisode clinique de type C (Le Maréchal, Hulin, *et al.* 2019; Bano *et al.* 2015), ou même chez des bovins n'ayant pas présenté de signes cliniques pour le type D (Steinman *et al.* 2006) ;
- chez des bovins sains, au sein de cheptels apparemment sains et situés à proximité d'élevages de volailles atteints de botulisme de type C/D (Souillard *et al.* 2015) ;
- chez les bovins en incubation, statut particulièrement difficile à appréhender, Bano (2018) indique, à propos d'un élevage bovin laitier italien atteint de botulisme de type C, que le suivi du portage fécal peut représenter une méthode intéressante, suggérant que celui-ci est susceptible d'apparaître avant la manifestation des premiers signes cliniques des malades à venir. En revanche, des études très récentes, menées en France par le LNR en 2019 et 2020 au sein de différents cheptels atteints de botulisme de type D/C, n'ont pas mis en évidence la présence de *Clostridium botulinum* dans les fèces de bovins au tout début de la phase clinique de la maladie.

Ainsi, il apparaît que le portage fécal de *C. botulinum* et/ou sa toxine chez les bovins, y compris au tout début de l'expression des premiers signes cliniques, semble être peu fréquent au sein de cheptels cliniquement atteints ou non de botulisme de type C, D, C/D et D/C.

Au cours des précédents chapitres, il a pu être établi par le GT que la circonstance présentant très vraisemblablement le plus haut degré de contamination fécale (excrétion) est celle d'une vache laitière en incubation ne présentant pas encore de signes cliniques.

Le travail de recensement et de hiérarchisation des facteurs de risque de contamination du lait par *C. botulinum* sous ses différentes formes s'est fondé sur la méthodologie classique des « 5 M » (matière, main d'œuvre, milieu, matériel et méthode). Sur la base d'un diagramme d'Ishikawa (Annexe 2), les experts ont répertorié l'ensemble des causes identifiables de contamination du lait, susceptibles de se produire lors des opérations de traite au sens large, c'est-à-dire avant, pendant et après la traite. En considération de la disparition quasi totale de la traite manuelle, ce travail s'est intéressé à la traite mécanique sous ses deux principales composantes, à savoir (i) la traite mécanique classique, quelles qu'en soient les modalités précises et la structure de la salle de traite elle-même, et (ii) la traite automatisée en station robotisée. Les particularités de chacune d'entre elles ne seront pas détaillées

ici, mais il convient de préciser que l'évaluation des causes de contamination a été réalisée en tenant compte de leurs spécificités respectives et en retenant la situation la plus à risque. À titre d'exemple, si l'opérateur de traite peut ne pas être considéré dans les causes possibles de contamination pour le système de traite robotisée, il est néanmoins susceptible de présenter un surcroît de risque pour d'autres causes identifiées (moindre efficacité de l'hygiène avant la pose des manchons trayeurs, augmentation de la fréquence de traite, absence de détournement du lait d'une vache présentant les premiers signes cliniques, un seul et même matériel de traite pour de nombreuses vaches, etc.).

Le tableau 8 propose une synthèse des principales causes de contamination du lait par *C. botulinum*, par transfert de matières fécales, au sein d'un élevage bovin atteint de botulisme, qu'il soit diagnostiqué et officiellement déclaré ou non, ainsi que les mesures de maîtrise et bonnes pratiques associées.

Tableau 8 : Principales causes de contamination du lait par *Clostridium botulinum* et mesures de maîtrise associées dans un élevage bovin atteint de botulisme

CAUSES ORIGINES	Mesure de maîtrise et bonnes pratiques associées
1. Avant la traite	
1.1 Mamelles, trayons et arrière-main souillés	Hygiène générale et entretien du logement et des animaux Isolement/infirmierie des animaux malades (toutes maladies) Qualité/propreté de la litière et des aliments Propreté générale des installations et des zones de traite, <i>i.e.</i> salle de traite et aire d'attente (matières fécales, débris alimentaires, poussières ...)
1.2. Défauts de procédure et d'hygiène lors de la préparation à la traite	Nettoyage des faisceaux trayeurs si souillés lors de la traite de la vache précédente Écarter le produit de la traite d'une vache malade ou convalescente Nettoyage régulier du quai de traite et du matériel de traite si souillés Nettoyage des trayons, élimination des premiers jets Hygiène et propreté des opérateurs de traite (mains, gants, avant-bras)
2. Pendant la traite	
Défauts de procédure lors de la traite	Technique de traite respectée limitant les contaminations environnementales Surveillance et « actions correctives » immédiates des incidents de traite Pose hygiénique des gobelets trayeurs (pas de contact avec le sol, avec les membres ou la queue de la vache)
3. Après la traite	
	Surveillance de la fin de traite et du décrochage des gobelets trayeurs Entretien, nettoyage et maintenance de l'ensemble du matériel de traite, d'amenée et de stockage du lait (bon fonctionnement, procédure automatisée) Nourrir les animaux juste après la traite et éviter qu'ils ne se couchent

L'ensemble des mesures de maîtrise et bonnes pratiques contenues dans ce tableau sont toutes de nature à prévenir ou minimiser les transferts de matières fécales au lait avant, pendant et après la traite, ainsi qu'à maintenir une bonne hygiène de la salle de traite. À ce titre, toute démarche planifiée permettant d'apporter une plus grande garantie dans leur réalisation pérenne doit être fortement encouragée.

4.1.2 Estimation de la concentration en *C. botulinum* dans le lait de tank

Les quantités de matières fécales apportées au cours de la traite sont variables et dépendent directement des bonnes pratiques d'hygiène lors de la traite. Plusieurs études ont caractérisé la variabilité de la quantité de matières fécales apportées au cours de la traite par extrapolation des données de dénombrements de *E. coli* relevées (Clough, Clancy et French 2009; Perrin *et al.* 2015). Ainsi, Clough, Clancy et French (2009) ont caractérisé la variabilité de la quantité de matières fécales apportées par traite et par animal. La loi de distribution définie par ces auteurs (loi gamma ($\alpha = 0,05$, $\beta = 1/600$)) a été utilisée par la suite pour estimer la quantité de matières fécales apportée pour un élevage de 100 vaches laitières.

Les quantités de *C. botulinum* dans les matières fécales sont également variables d'un animal à l'autre. Parmi les quelques travaux disponibles (présentés en 4.1.1), les données de Souillard *et al.* (2015) ont été utilisées pour estimer cette variabilité. Cette étude portait sur des bovins sans signes cliniques apparents au sein de cheptels situés à proximité d'élevages de volailles atteints de botulisme de type C. Les paramètres de la loi lognormale décrivant la concentration de *C. botulinum* ont pu être déterminés à partir de la proportion d'échantillons de matières fécales dans lesquels *C. botulinum* a pu être détecté. L'estimation de la variabilité des concentrations dépend également de la limite de quantification. La fonction `fitdiscens` du package R `fitdistrplus` a été utilisée par le GT pour ajuster les paramètres de la loi de distribution sachant la limite de détection (LOD) et la proportion d'échantillons positifs. L'annexe 3 illustre la variabilité et l'incertitude des niveaux de contamination estimés pour une LOD de 1000 ufc/g de *C. botulinum* dans les matières fécales.

La quantité de *C. botulinum* présente dans le lait a été estimée par le GT en intégrant ces deux sources de variabilité (c'est-à-dire la quantité de matières fécales et la concentration dans les matières fécales). Dix mille itérations ont été utilisées pour caractériser la variabilité des niveaux de contamination pour un troupeau de 100 vaches laitières, produisant chacune 15 litres de lait par traite. Plusieurs hypothèses ont été testées. La première concerne le nombre de bovins porteurs au sein du troupeau, la seconde concerne la LOD. Le tableau 9 présente le 95^e percentile du niveau de contamination en *C. botulinum* du lait de tank.

Tableau 9 : 95^e percentile des niveaux de contamination en *C. botulinum* (en bactérie/litre) dans les laits de tank pour des exploitations de 100 vaches laitières, estimation réalisée par le GT à partir des données de Souillard *et al.* (2015).

		Proportion de bovins porteurs asymptomatiques	
		10 %	50 %
Limite de détection (ufc de <i>C. botulinum</i> par g de matières fécales)	500	1	15
	1 000	2	38
	3 000	7	111

Le tableau 9 montre que dans la situation la plus défavorable considérée (LOD = 3 000 ufc/g et 50 % de vaches laitières porteuses asymptomatiques) la concentration en *C. botulinum* sera inférieure à 111 bactérie/litre de lait dans 95 % des cas.

En outre, le ramassage du lait à l'aide de camion-citerne concerne généralement plusieurs fermes. Le lait de plusieurs camions-citernes peut également être mélangé avant la transformation, pour constituer des lots de matières premières plus importants (tanks de grand mélange).

4.2 Collecte/ transport du lait cru

Le lait cru est le lait produit par la sécrétion de la glande mammaire d'animaux d'élevage, non chauffé à plus de 40 °C ni soumis à un traitement d'effet équivalent (Règlement (CE) n° 853/2004). Le règlement (CE) n° 853/2004 dans son annexe III section IX chapitre I explicite les exigences sanitaires applicables à la production de lait cru en matière de santé des animaux, et d'hygiène pendant la traite, la collecte et le transport ainsi que les critères applicables au lait cru.

La séquence suivante correspond donc au parcours qu'effectue le lait depuis sa collecte dans les tanks individuels de stockage et sa réfrigération dans les exploitations jusqu'à la laiterie, qui correspond au lieu où se déroulent plusieurs vérifications et analyses, ainsi que diverses transformations. Celles-ci peuvent aboutir selon les cas à des produits soit destinés aux consommateurs, soit dirigés vers des ateliers spécialisés. En fonction des filières de transformation et de fabrication, le lait de chaque

exploitation est collecté selon une fréquence variable : quotidienne, tous les deux jours ou au maximum, tous les trois jours. Lors du soutirage du tank individuel dans la citerne du camion de collecte, le lait de chaque exploitation est échantillonné de manière à être soumis à certaines analyses spécifiques. Ces analyses s'inscrivent dans le cadre réglementaire du paiement du lait à la qualité (PLQ), dont les différents paramètres permettent de connaître, d'une part, la qualité et la composition du lait collecté (taux butyreux et protéique) et d'autre part, sa salubrité (détection de la présence d'inhibiteurs, dénombrements bactériens, numération des cellules somatiques...) et sa conformité (détection d'un éventuel mouillage par cryoscopie). Si certaines analyses sont réalisées systématiquement, c'est-à-dire à chaque collecte (taux butyreux et protéique, cellules somatiques et inhibiteurs), d'autres ne le sont qu'à une fréquence qui leur est propre, et ce, sur une collecte choisie de manière aléatoire. À titre d'exemple, la numération des microorganismes mésophiles doit être réalisée au moins une fois par décade, celle des spores butyriques au moins une fois par quinzaine et la cryoscopie au moins une fois par semaine.

En raison des volumes collectés, les citernes ou compartiments de citernes des camions de collecte ainsi que les tanks de grand mélange contiennent des laits provenant de plusieurs exploitations, ce qui correspond à un facteur de dilution supplémentaire de la contamination éventuelle (Cf.4.1.2). Une dilution d'un facteur 10 est retenue par le GT : une ferme de 100 vaches est supposée produire 5 000 litres par tournée de collecte du lait, et cette quantité est mélangée à 45 000 litres de lait provenant de 9 autres élevages non infectés.

La réglementation impose que le transport permette de maintenir l'entièreté du volume du lait de la citerne à une température inférieure à +6 °C. Par dérogation, certains cahiers des charges spécifiques de certaines AOP fromagères exigent une température de stockage de 12 °C pour la production de fromages au lait cru. Il convient d'attirer l'attention sur la propreté des matériels utilisés lors des différents transferts du lait, c'est-à-dire lors de son soutirage du tank individuel dans la citerne de collecte et lors de son dépotage et de sa réception à la laiterie ou à l'atelier de transformation, ainsi que sur le nettoyage et la désinfection de la citerne de collecte après sa vidange, cela doit constituer des points de vigilance.

4.3 Transformation

Les produits laitiers considérés sont les suivants : lait (pasteurisé, stérilisé, microfiltré), poudre de lait (incluant la poudre de lactosérum). Compte tenu du contexte de la saisine (gestion de produits laitiers issus de foyers de botulisme), le GT a évalué l'évolution d'une contamination apportée par la matière première (lait cru), excluant d'autres sources potentielles que sont les ingrédients non laitiers ou l'environnement de production.

Selon l'estimation réalisée en 4.1.2, dans la situation la plus défavorable, la concentration en *C. botulinum* sera inférieure à 111 bactéries/litre de lait de tank dans 95 % des cas, situation à laquelle peut se rajouter un facteur 10 de dilution supplémentaire. Par ailleurs, les températures de conservation du lait à la ferme et au cours du transport (6 °C) ne permettent ni la germination des spores ni la croissance des cellules végétatives.

La figure 16 présente les principales opérations de transformations permettant, à partir du lait collecté, l'obtention des différents produits choisis comme exemples par le GT.

Pour les produits considérés, les 4 procédés principaux mis en œuvre sont :

- deux traitements thermiques d'inactivation : pasteurisation et stérilisation UHT (upérisation) ;
- deux traitements physiques d'élimination : bactofugation et filtration membranaire.

Il est à noter que certains de ces traitements peuvent être associés. Par exemple, la bactofugation et la filtration sont souvent couplées à une pasteurisation. Ce sont deux procédés qui vont éliminer physiquement les microorganismes du lait sans distinction. À ce titre, on peut les considérer comme

« assainissants ». Pour les procédés avec filtration, l'effet assainissant augmentera avec la diminution du diamètre des pores, mais les problèmes de colmatage aussi. Comme indiqué en section 2.4.2, ces deux procédés n'ont pas d'impact sur les exotoxines.

Les barèmes définis pour les pasteurisations basse (63 °C, 30 min) et haute (72 °C, 15 s) du lait permettent l'inactivation des formes végétatives des microorganismes pathogènes du lait, dont *Mycobacterium bovis* et *Coxiella burnetii* qui sont retenus pour définir l'efficacité de la pasteurisation. Comme vu précédemment, ces barèmes n'ont pas d'effet sur les spores de *C. botulinum* de types C et D. La conservation impérative de ces produits au froid évitera toute production de toxines par les formes végétatives issues de spores ayant échappé à la pasteurisation. De ce point de vue, l'ajout post-pasteurisation d'une séquence de bactofugation constitue un élément renforçant la maîtrise du risque.

L'upérisation, compte tenu des barèmes annoncés et des valeurs connues permettant l'inactivation des spores et des toxines de *C. botulinum* de types C et D, est un procédé présentant une grande marge de sécurité vis-à-vis de ces dangers.

La succession des opérations de transformation pour obtenir les produits considérés (lait pasteurisé, microfiltré, bactofugé, poudre de lait) est de nature à réduire de manière significative la contamination initiale éventuelle par *C. botulinum* (Figure 16). Enfin, le respect des conditions de conservation et de préparation des aliments par les consommateurs devrait limiter toute possibilité de croissance et de toxinogénèse à partir des éventuelles spores ayant échappé aux traitements.

S'agissant spécifiquement des poudres de lait infantile, la question du risque de botulisme infantile suite à l'ingestion de spores par des nourrissons de moins de douze mois se pose. La question des dangers potentiels des préparations infantiles a fait l'objet de plusieurs travaux (FAO/WHO 2004, 2007; Anses 2020a). Bien que des souches de *Clostridium* aient été détectées dans des poudres de lait - incluant les poudres infantiles - l'implication de poudres infantiles dans des cas de botulisme infantile n'a jamais été démontrée (Doyle *et al.* 2015). *C. botulinum* a été classée par la FAO et l'OMS dans le groupe C (responsabilité peu plausible ou pas encore démontrée) des dangers en lien avec les préparations en poudre pour nourrissons (FAO/WHO 2004, 2007). Les données épidémiologiques disponibles ne permettent pas de remettre en cause les conclusions de cette évaluation, même avec une attention particulière pour les souches du groupe III. À ce jour, seul un cas de botulisme infantile de type C a été rapporté pour lequel une origine environnementale était suspectée.

Tableau 10 : Récapitulatif de l'impact des procédés applicables en filière laitière bovine sur les différentes formes de *C. botulinum* du groupe III

		Cellule végétative	Spore	Toxine
Traitement thermique				
<i>Caractéristique générale du danger au regard d'un traitement thermique</i>		<i>Pas de résistance particulière à la chaleur*</i>	$D_{100} = 0,89 \text{ min}$ $D_{90} = 8,9 \text{ min}$ $D_{80} = 89 \text{ min}$ $z = 10$	$2 \text{ min à } 80 \text{ °C}$ (99 % d'inactivation) $2 \text{ min à } 90 \text{ °C}$ (inactivation totale)
UHT/Stérilisation	120 °C - 20 min** 140 °C - 4 s**	> 6 D	>12 D	Inactivation totale
Pasteurisation	72 °C – 15 s**	> 6 D	Pas d'effet	Inactivation partielle
	63 °C – 30 min**	> 6 D	Pas d'effet	Inactivation partielle
Autres procédés				
Evaporation/Séchage		Pas de donnée mais très faible impact probable	Pas d'effet	Pas de données
Séparations centrifuges	Clarification	Pas d'effet	Pas d'effet	Pas d'effet
	Ecrémage - Standardisation	Pas d'effet	Pas d'effet	Pas d'effet
	Bactofugation***	Réduction de 1 à 2 log	Réduction de 1 à 2 log	Pas d'effet
Microfiltration***		Réduction de 2 à 3 log	Réduction de 2 à 3 log	Pas d'effet – Les toxines ne sont pas retenues par les membranes de filtration
Homogénéisation sous ultrapression****	200-350 MPa / 55 - 85 °C	Pas de données mais les pressions et températures mises en œuvre sont de nature à inactiver les cellules végétatives	Pas de données pour <i>C. botulinum</i> (Réduction de 2 à 6 log pour autres spores)	Pas de données

-*la pasteurisation du lait permet l'inactivation de toutes les cellules végétatives ; ** ou toute autre combinaison temps-température permettant d'obtenir un effet équivalent. - ***Pas de résistance connue, impact indépendant de la forme (cellule ou spore) - ****Température et pression élevées.

- ==== Possibilité de contamination par *C. botulinum* (spores et cellules végétatives)
- Inactivation totale des spores, cellules et toxines de *C. botulinum*
- Inactivation totale des cellules (> 6D) et Inactivation partielle des toxines de *C. botulinum*
- - - 1 à 3 réductions décimales des spores et cellules de *C. botulinum*

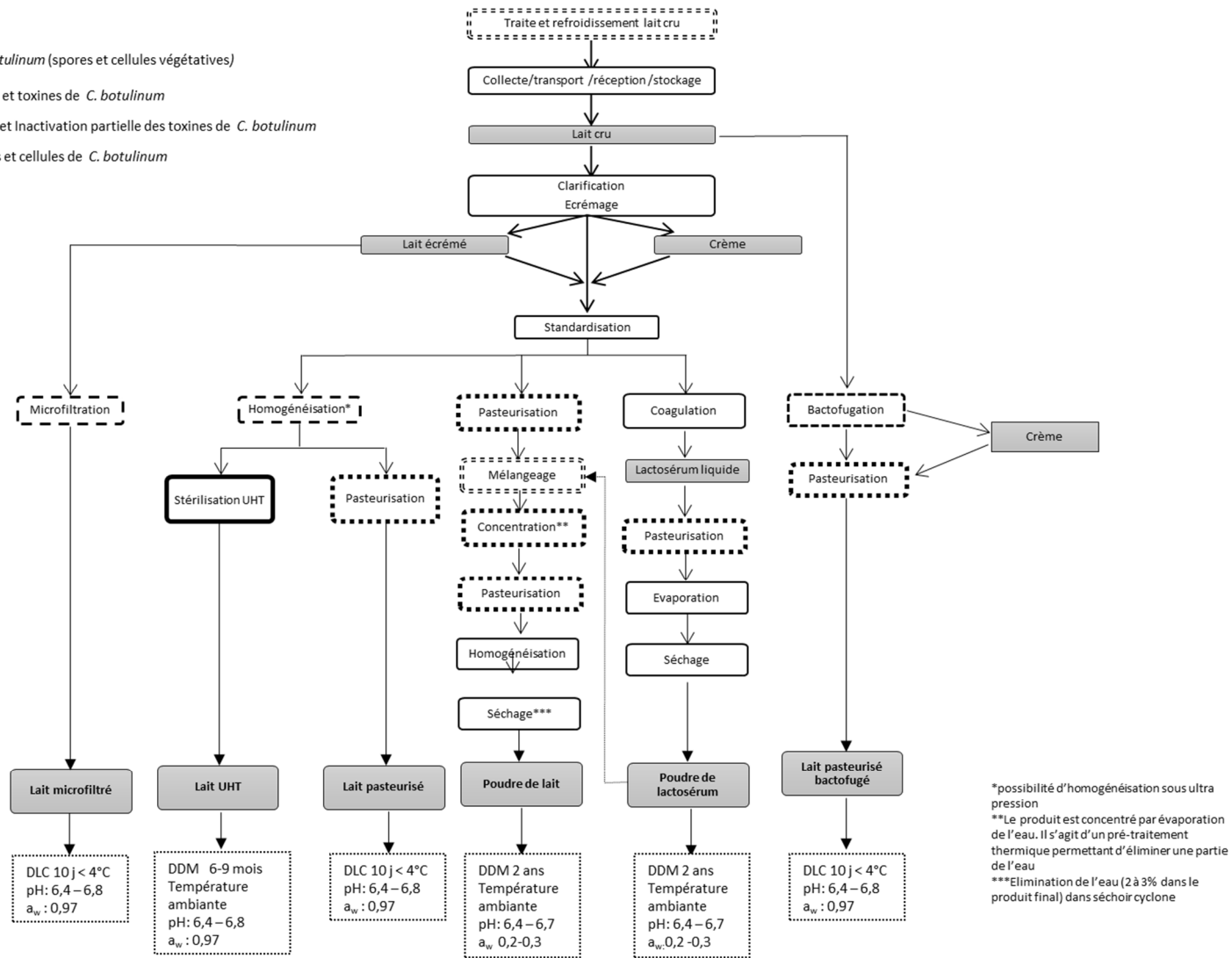


Figure 16 : Impact des opérations de transformation des produits laitiers considérés sur les différentes formes de *C. botulinum* du groupe III

1
2

5 Conclusions du groupe de travail

En France, les foyers de botulisme bovin concernent dans la majorité des cas des élevages laitiers et sont dus aux types toxiques mosaïque D/C (majoritaire), C, mosaïque C/D et plus rarement D. L'incidence sur les 10 dernières années est en moyenne d'une dizaine de foyers en élevage bovin par an. Entre 2008 et 2018, l'incidence du botulisme humain est en moyenne de 7,5 foyers/an (trois à 13 foyers) et de 14,5 cas/an (quatre à 25 cas). Les types de toxines botuliques en cause sont les types A et B puis E, occasionnellement F. Aucun foyer/cas de botulisme humain de types C, D ou mosaïques C/D et D/C n'a été recensé en France entre 2008 et 2018.

Il apparaît important dans ce contexte de rappeler la démarche d'évaluation du caractère zoonotique des *C. botulinum* de types C, D et mosaïques réalisée par le GT socle. Les données épidémiologiques disponibles permettent d'établir une relation causale entre l'exposition à la toxine botulique et/ou *Clostridium botulinum* de type C et la survenue de cas de botulisme humain (deux foyers confirmés dont l'un d'origine aviaire rapportés par la littérature internationale). Néanmoins, les sources de contamination n'ont pas été formellement confirmées et une incertitude faible demeure sur l'origine zoonotique de ces cas. S'agissant du type D, un seul foyer de botulisme alimentaire a été identifié dans le monde sur la période étudiée, dans lequel l'exposition à la toxine botulique de type D était suspectée. La faible sensibilité de l'être humain aux toxines C, D et mosaïques est l'hypothèse privilégiée pour expliquer la quasi-absence de cas liés aux types C, D, C/D, D/C.

Le GT a procédé à l'évaluation des mesures de maîtrise du danger applicables tout au long de la filière bovine (de l'élevage à la consommation) lors de la détection d'un foyer de botulisme bovin en suivant les étapes suivantes :

- évaluation qualitative de la probabilité d'émission du danger dans les tissus animaux (en fonction du statut clinique des animaux) ;
- identification des causes et des facteurs de risque de contamination des animaux, des produits carnés et laitiers ainsi que l'exposition des opérateurs ;
- évaluation des possibilités de contamination, de croissance et de toxinogenèse de *C. botulinum* de l'élevage à la consommation avec comme point de départ un foyer clinique ;
- évaluation de l'efficacité des mesures de maîtrise existantes vis-à-vis du danger.

Les bovins peuvent être atteints de botulisme de types B et A, plus dangereux pour l'Homme mais les foyers en élevage liés à ces types ne sont pas constatés en France. L'expertise du GT s'est donc focalisée sur les types D, D/C, C et C/D.

Aussi, les réponses aux questions telles que reformulées par le GT sont les suivantes :

- **Dans le cas d'un foyer de botulisme bovin, les produits issus d'animaux (lait, viande, abats) sont-ils susceptibles de contenir des spores/toxines de *C. botulinum* ? Comment l'état de santé des animaux influence-t-il le niveau de contamination des produits ?**

Plusieurs statuts caractérisent les bovins appartenant à un cheptel atteint de botulisme : malades (présentant des signes cliniques de botulisme), futurs malades (en incubation), animaux convalescents (guéris cliniquement) et animaux qui resteront sans signes cliniques (ayant ingéré une quantité trop faible de toxine et/ou ne développant pas de toxi-infection ou non exposés si la contamination n'est pas répartie de façon homogène dans l'aliment).

Les produits issus d'animaux malades sont écartés de la chaîne alimentaire. Dans ces conditions, seul a été pris en compte le cas des animaux appartenant au lot ayant consommé l'aliment supposé contaminé qui sont acheminés vers un abattoir ou dont le lait est collecté avant le signalement du cas index. Dans le laps de temps qui précède la détection du cas index, tous les bovins ayant partagé le même aliment doivent être considérés comme potentiellement en incubation. Il en est de même, au-delà de la détection du cas index et en tenant compte des délais possibles d'incubation, des autres bovins du cheptel.

Peu de données sont disponibles sur la présence du danger dans les tissus et sécrétions des bovins. À partir des quelques données disponibles, le GT a évalué qualitativement la probabilité de présence de spores, cellules végétatives et toxines de *C. botulinum* dans les produits et tissus manipulés à l'abattoir ou destinés à la consommation humaine (viandes, abats, lait) (cf. Tableau 4). Ainsi, les produits issus d'animaux sont susceptibles de contenir des spores, des cellules végétatives et des toxines de *C. botulinum* avec une prévalence et un niveau de contamination dépendant du statut clinique des animaux :

- le portage digestif de *C. botulinum* peut être détecté de manière transitoire et/ou intermittente dans des cheptels bovins apparemment sains à une prévalence estimée entre 1 et 4 %. Après distribution d'un aliment contaminé, en comparaison avec un élevage tout-venant, le taux de portage intestinal des spores de types C, D ou mosaïques sera plus important pour les bovins qu'ils soient en incubation ou qu'ils demeurent sans signes cliniques ;
- la présence de formes végétatives et de toxines dans le foie est largement démontrée par les opérations de diagnostic chez les bovins atteints de botulisme. La probabilité de présence de ces formes du danger dans le foie chez le bovin en incubation a été estimée comme élevée ;
- en dehors du tissu hépatique, peu de données sont disponibles sur la présence du danger dans les viandes et abats issus d'un bovin présentant des signes cliniques et a fortiori chez ceux asymptomatiques mais en phase d'incubation ;
- à l'abattoir, le contenu du tube digestif constitue une source de contamination directe ou indirecte de la carcasse durant les opérations d'habillage ;
- les souillures fécales constituent également une source de contamination du lait au moment de la traite. Selon l'estimation réalisée par le GT, dans la situation la plus défavorable (50 % bovins porteurs asymptomatiques, LOD = 3 000 ufc de *C. botulinum* par g de matières fécales), la concentration en *C. botulinum* resterait inférieure à une valeur de l'ordre de 2 log ufc/l de lait de tank (le calcul donne une distribution de concentrations inférieures à 111 bactéries/litre de lait de tank dans 95 % des cas).

• **Dans la filière viande bovine, les mesures appliquées de l'élevage à la consommation permettent-elles de maîtriser le danger dans les produits carnés (issus d'animaux en incubation/animaux restant indemnes)? Le cas échéant, existe-t-il des mesures supplémentaires pour diminuer l'exposition par les produits carnés ?**

Les bonnes pratiques d'élevage et la mise en place de mesures de biosécurité permettent de prévenir à la fois la survenue d'un épisode de botulisme en élevage bovin, mais également la présence de *C. botulinum* dans l'environnement direct des animaux, en particulier :

- le renforcement de la biosécurité pour les élevages mixtes ;
- la surveillance de l'état de santé des animaux, par exemple via l'observatoire de la mortalité des animaux de rente (OMAR) ;
- le diagnostic vétérinaire précoce.

Pour limiter le risque que pourraient représenter les animaux porteurs sans signes cliniques, certaines mesures peuvent être renforcées pour tout animal de l'élevage suspect et/ou reconnu atteint conduit à l'abattoir, jusqu'à la maîtrise complète du foyer clinique :

- la propreté des animaux (revêtement cutané et phanères) ;

- la mise à la diète préalable de l'animal en fonction de l'horaire prévisible de son abattage (24 h avant) ;
- l'isolement de l'animal au cours du transport, ainsi que lors du déchargement et dans la stabulation de l'établissement d'abattage afin d'éviter les transferts de contamination entre lots ;
- l'inscription du botulisme dans les informations sur la chaîne alimentaire (ICA).

Enfin, le GT recommande le maintien des enquêtes épidémiologiques faites par les DDPP lors de la détection d'un foyer malgré le changement éventuel de la réglementation prévu en 2021 en application de la Loi de Santé Animale.

De la stabulation à la chambre froide, il apparaît que les bonnes pratiques d'abattage et les BPH au sens large sont suffisantes pour maîtriser le transfert du danger à la viande, à la condition expresse de leur mise en œuvre effective et constante. À ce titre, le GT ne peut que recommander toute démarche de management de l'hygiène permettant d'attester de cette mise en œuvre, comme les BPHs (bonnes pratiques d'hygiène surveillées) par exemple. Le GT souhaite néanmoins attirer l'attention sur certains points qui méritent une vigilance accrue pour ces animaux issus d'un élevage où des signes cliniques de botulisme ont été suspectés/confirmés :

- l'inspection vétérinaire *ante mortem* qui doit inclure l'examen de signes cliniques pouvant évoquer le botulisme ;
- renforcer l'évaluation *ante mortem* de la propreté des animaux, qui devrait être estimée de façon objective et conduire à une pratique d'abattages logistiques ;
- la manipulation des foies et des réservoirs digestifs devrait être limitée et la valorisation alimentaire de ces abats exclue.

Au stade de la découpe, la conception hygiénique des ateliers et des équipements utilisés, ainsi que l'organisation des activités de découpe sur la base de bonnes pratiques hygiéniques et de démarche HACCP sont de nature à maîtriser les transferts des spores éventuellement présentes, leur germination, la croissance des formes végétatives ainsi que la production de toxines. Le GT souhaite porter l'attention sur certains points de vigilance : la chaîne du froid et le nettoyage/désinfection des surfaces, matériels et équipements.

Les possibilités de croissance et de toxinogenèse de *C. botulinum* du groupe III ont été évaluées au cours de la transformation de trois produits carnés bovins : viande hachée, salaison sèche (type viande des grisons), terrine de foie. Cette sélection a permis d'illustrer l'impact de différents procédés de transformation et de mesures de maîtrise sur *C. botulinum* : maîtrise de la chaîne du froid, séchage, ajout de sel et de conservateurs, traitement thermique, limitation de la durée de vie de l'aliment. L'application effective de ces mesures permet de maîtriser la croissance et la toxinogenèse *C. botulinum* du groupe III, dans les produits carnés bovins.

• **La manipulation de la carcasse en abattoir d'un animal issu d'un lot de bovins atteint de botulisme mais dépourvu de signes cliniques présente-t-elle un risque pour les employés de contracter le botulisme ? Le cas échéant, comment le maîtriser ?**

L'exposition professionnelle des opérateurs tout au long des séquences transport-abattage concerne les chauffeurs, les bouviers et les opérateurs sur chaîne. Le GT a procédé à l'identification exhaustive des différentes possibilités d'exposition au regard des principaux modes de transmission (INRS) :

- inoculation par blessure ou coupure avec des objets contaminés ;
- ingestion manuportée (port à la bouche des mains ou d'objets contaminés) ;
- inhalation de poussières sur le lieu de travail.

Il convient de noter qu'au regard de tous les modes de transmission, les personnes les plus exposées sont les éleveurs.

Toutes les possibilités d'exposition professionnelle sont présentées, même si leur survenue est hautement improbable. En effet, le contexte épidémiologique se traduit par l'absence de cas rapporté de botulisme en milieu professionnel tant en élevage qu'à l'abattoir. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la présence à l'abattoir de ce type d'animaux est peu fréquente, et/ou que, les bonnes pratiques d'hygiène sont suffisantes pour limiter l'exposition des opérateurs.

- Botulisme par inoculation

Toute manipulation d'objet coupant peut être considérée comme une voie potentielle d'exposition par inoculation à la suite d'une blessure ou d'une coupure avec un objet possiblement contaminé par des spores, des cellules végétatives ou des toxines. Les mesures de protection appliquées à l'abattoir permettent de limiter/maîtriser le risque de botulisme par coupure.

- Botulisme par inhalation

La nécessité que la toxine soit présente en grande quantité au niveau des muqueuses nasales des travailleurs en abattoir rend très improbable un botulisme par inhalation. L'inhalation seule de spores ne causera pas cette forme de botulisme. En effet, les conditions d'anaérobiose nécessaires à la germination et à la production de toxine ne sont pas présentes dans les voies respiratoires. À la suite de l'inhalation de spores, il peut y avoir remontée mucociliaire puis déglutition de celles-ci. Mais seul un botulisme infectieux de l'adulte pourrait être envisagé par ce mécanisme. Les conditions médicales prédisposant à un botulisme infectieux de l'adulte sont incompatibles avec le travail à l'abattoir.

- Botulisme suite à l'ingestion de toxines (manuportées)

Les toxines provenant d'un animal en incubation pourraient être ingérées par les opérateurs par l'intermédiaire de mains souillées. L'application des BPH (le lavage des mains en particulier) permet de maîtriser ce risque.

- **Les mesures appliquées de l'élevage à la consommation permettent-elles de maîtriser le danger dans les produits laitiers ? Quelle est l'efficacité des différents traitements du lait sur les formes végétatives et sporulées (pasteurisation, traitement UHT, bactofugation, filtration membranaire) ? Le cas échéant, existe-t-il des mesures supplémentaires pour diminuer l'exposition par les produits laitiers ?**

Le GT a identifié les principales causes de contamination du lait par *C. botulinum*, par transfert de matières fécales, au sein d'un élevage bovin atteint de botulisme, ainsi que les mesures de maîtrise associées. Ces mesures identifiées dans le tableau 8 sont de nature à minimiser la contamination du lait cru par *C. botulinum* par les vaches ne présentant pas de signes cliniques.

Selon l'estimation du GT, même dans le scénario le plus défavorable envisagé (situation exceptionnelle d'un élevage avec 50 % d'animaux excréteurs), la concentration en *C. botulinum* dans le lait livré serait de l'ordre de 1 log ufc/l (la concentration dans le lait dans cette situation exceptionnelle resterait inférieure à 111 bactérie/litre de lait de tank dans 95 % des cas, situation à laquelle se rajoute un facteur 10 de dilution pour le lait de tank de grand mélange destiné à la transformation).

S'agissant de l'efficacité des procédés de traitement du lait sur les *C. botulinum* du groupe III (types C, D et mosaïques) :

- les barèmes définis pour les pasteurisations basse (63°C, 30 min) et haute (72°C, 15 s) du lait permettent l'inactivation totale des cellules végétatives, l'inactivation partielle des toxines mais n'ont pas d'effet sur les spores ;
- la stérilisation UHT (140 °C, 4 s ou toute autre combinaison équivalente) permet l'inactivation des spores, des cellules et des toxines ;
- la bactofugation et la filtration membranaire permettent d'éliminer physiquement (1 à 3 réductions décimales) les microorganismes du lait sans distinction, mais n'ont pas d'effet sur les exotoxines. La bactofugation et la filtration sont souvent couplées à une pasteurisation.

La succession des opérations de transformation pour obtenir les produits considérés (lait pasteurisé, microfiltré, bactofugé, poudre de lait) est de nature à réduire de manière significative la contamination initiale éventuelle (cf. Figure 16).

Enfin, le respect des conditions de conservation et de préparation des aliments par les consommateurs devrait limiter toute possibilité de croissance et de toxinogénèse à partir des éventuelles spores ayant échappé aux traitements.

La quasi-absence de cas de botulisme humain liés aux types C, D et mosaïques conforte les conclusions de l'évaluation. Les produits carnés et laitiers d'origine bovine ont rarement été identifiés comme source de botulisme et aucun cas lié aux types C, D ou mosaïques n'a été rapporté.

Les principales sources d'incertitudes ainsi que les modalités de leur prise en compte par le GT sont présentées en annexe 4. Le CES BIORISK émet des recommandations pour l'acquisition de données concernant plus particulièrement les points suivants :

- les transferts éventuels (type bactériémie digestive) des différentes formes de *C. botulinum* vers les torrents circulatoires (réalité, mécanismes et facteurs) ;
- l'effet des traitements physiques (et chimiques) de préservation des aliments au regard des différentes formes de *C. botulinum* (à confirmer en matrices alimentaires).

Date de validation du rapport d'expertise collective par le groupe de travail et par le comité d'experts spécialisé : 9 juillet 2021

6 Bibliographie

- Afssa. 2008. *Avis de de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif aux critères microbiologiques exigibles pour le lait cru de bovin livré en l'état et destiné à la consommation humaine.* <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2007sa0149.pdf>.
- Alais, C. 1984. *Science du lait: principes des techniques laitières.* Paris: Éditions SEPAIC.
- Allison, M. J., S. E. Maloy et R. R. Matson. 1976. "Inactivation of Clostridium botulinum toxin by ruminal microbes from cattle and sheep." *Appl Environ Microbiol* 32 (5): 685-8. <https://doi.org/10.1128/aem.32.5.685-688.1976>.
- Anderson, J., P. T. Williams, A. M. Katos, M. Krasna, W. Burrows et C. J. Hilmas. 2009. "CHAPTER 30 - Botulinum Toxin." Dans *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, édité par Ramesh C. Gupta, 407-432. San Diego: Academic Press.
- Anses. 2015. *Avis relatif à un projet de décret pris en application de l'article L. 214-1 du code de la consommation et concernant l'étiquetage du lait cru destiné à être remis en l'état au consommateur final.* <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2015SA0114.pdf>.
- Anses. 2017. *Illustrations et actualisation des recommandations pour l'évaluation du poids des preuves et l'analyse d'incertitude à l'Anses.* (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/AUTRE2015SA0089Ra-2.pdf>.
- Anses. 2019. Fiche-outil relative à la réalisation de documents synthétiques à destination des tutelles et des rédacteurs de GBPH : Eléments pour évaluer l'efficacité d'un traitement thermique sur la contamination microbiologique des aliments.
- Anses. 2020a. *Avis de l'Anses du 4 février 2020 relatif à la filière de production des préparations en poudre pour nourrissons.* <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2018SA0264.pdf>.
- Anses. 2020b. *Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : "Clostridium botulinum, Clostridium neurotoxigènes".* Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2016SA0074Fi.pdf>.
- Anses. 2021a. *Clostridium botulinum : mise à jour des connaissances sur les différentes formes des types C, D, mosaïque C/D et D/C et E*
- Anses. 2021b. *Modalités de maîtrise du risque lié à la présence de dangers bactériologiques dans les fromages et produits laitiers fabriqués à partir de lait cru.*
- Arnon, S. S., R. Schechter, T. V. Inglesby, D. A. Henderson, J. G. Bartlett, M. S. Ascher, E. Eitzen, A. D. Fine, J. Hauer, M. Layton, S. Lillibridge, M. T. Osterholm, T. O'Toole, G. Parker, T. M. Perl, P. Russell, D. L. Swerdlow, K. Tonat et f. t. W. G. o. C. Biodefense. 2001. "Botulinum Toxin as a Biological Weapon Medical and Public Health Management." *JAMA* 285 (8): 1059-1070. <https://doi.org/10.1001/jama.285.8.1059>.
- Bano, L. 2018. "Recent animal botulism outbreaks in Europe: update from the Laboratory of Treviso " Animal health and Welfare ERA-Net, Uppsala, 11-12 April, 2018.
- Bano, L. 2019. "Botulism in farmed animals." Workshop on risk associated with animal botulism and ANIBOTNET final meeting, Maisons-Alfort.
- Bano, L., I. Drigo, E. Tonon, G. Berto, A. Tavella, C. Woudstra, K. Capello et F. Agnoletti. 2015. "Evidence for a natural humoral response in dairy cattle affected by persistent botulism sustained by non-chimeric type C strains." *Anaerobe* 36: 25-29. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.09.007>.
- Barash, J. R. et S. S. Arnon. 2014. "A novel strain of Clostridium botulinum that produces type B and type H botulinum toxins." *J Infect Dis* 209 (2): 183-91. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit449>.

- Bernardor, J., J. Neveu, H. Haas, G. Pitelet, M. R. Popoff, C. Mazuet, E. Bérard, C. Boulay et B. Chabrol. 2018. "Infant botulism: Two case reports and electroneuromyogram findings." *Archives de Pédiatrie* 25 (5): 340-343.
- Birch, T. B. et T. P. Bleck. 2019. "Botulism (*Clostridium botulinum*)." Dans *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (9th Edition)*, édité par John E. Bennett, Raphael Dolin et Martin J. Blaser. Philadelphia: W.B. Saunders.
- Bohnel, H. et F. Gessler. 2013. "Presence of *Clostridium botulinum* and botulinum toxin in milk and udder tissue of dairy cows with suspected botulism." *Vet Rec* 172 (15): 397. <https://doi.org/10.1136/vr.100418>.
- Böhnel, H., B. Neufeld et F. Gessler. 2005. "Botulinum neurotoxin type B in milk from a cow affected by visceral botulism." *The Veterinary Journal* 169 (1): 124-125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.01.006>.
- Böhnel, H., C. Wagner et F. Gessler. 2008. "Tonsils – Place of botulinum toxin production: Results of routine laboratory diagnosis in farm animals." *Veterinary Microbiology* 130 (3): 403-409. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.02.003>.
- Braun, U., K. Feige, G. Schweizer et A. Pospischil. 2005. "Clinical findings and treatment of 30 cattle with botulism." *Veterinary Record* 156 (14): 438-441.
- CAC, C. d. C. A. 2007. Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk management CAC/GL 63-2007. Annex I suggested elements to include in a microbiological risk profile.
- Carlin, F. 2011. "Origin of bacterial spores contaminating foods." *Food Microbiology* 28 (2): 177-182. <https://doi.org/DOI:10.1016/j.fm.2010.07.008>.
- Clough, H. E., D. Clancy et N. P. French. 2009. "Quantifying exposure to Vero-cytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in milk sold as pasteurized: A model-based approach." *International Journal of Food Microbiology* 131 (2): 95-105. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.036>.
- Coffield, J. A., N. Bakry, R. D. Zhang, J. Carlson, L. G. Gomella et L. L. Simpson. 1997. "In vitro characterization of botulinum toxin types A, C and D action on human tissues: combined electrophysiologic, pharmacologic and molecular biologic approaches." *J Pharmacol Exp Ther* 280 (3): 1489-98.
- Connan, C., C. Deneve, C. Mazuet et M. R. Popoff. 2013. "Regulation of toxin synthesis in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*." *Toxicon* 75: 90-100. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.06.001>.
- Dahlenborg, M., E. Borch et P. Rådström. 2003. "Prevalence of *Clostridium botulinum* types B, E and F in faecal samples from Swedish cattle." *International Journal of Food Microbiology* 82 (2): 105-110. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00255-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00255-6).
- DasGupta, B. R. 2006. "Botulinum neurotoxins: perspective on their existence and as polyproteins harboring viral proteases." *J Gen Appl Microbiol* 52 (1): 1-8. <https://doi.org/10.2323/jgam.52.1>.
- Deumier, F. 2000. "Formulation et déshydratation de viande de volaille par immersion. Étude des transferts de matière à pression atmosphérique et sous vide." ENSIA (AgroParisTech). <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00709458>.
- Diao, M. M., S. Andre et J. M. Membre. 2014. "Meta-analysis of D-values of proteolytic *Clostridium botulinum* and its surrogate strain *Clostridium sporogenes* PA 3679." *Int J Food Microbiol* 174: 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.029>.
- Dodds, K. L. 1993. "*Clostridium botulinum* in foods." Dans *Clostridium botulinum. Ecology and control in foods*, édité par A. H. W. Haushchild et K.M. Dodds, 53-68. New York: Marcel Dekker

- Doutre, M. P. 1969. "Fréquence au Sénégal du botulisme animal d'origine hydrique." *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* 22 (1): 29-31.
- Doyle, C. J., D. Gleeson, K. Jordan, T. P. Beresford, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald et P. D. Cotter. 2015. "Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products." *Int J Food Microbiol* 197: 77-87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.022>.
- Dressler, D., K. Kollwe, T. H. C. Kruger, N. Gade, S. Sikorra et H. Bigalke. 2019. "Botulinum toxin type D blocks autonomic cholinergic synapses in humans: discussion of a potential therapeutic use." *Journal of Neural Transmission* 126 (10): 1337-1340. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02029-5>.
- Dürre, P. 2014. "Physiology and Sporulation in *Clostridium*." *Microbiology Spectrum* 2 (4). <https://doi.org/doi:10.1128/microbiolspec.TBS-0010-2012>.
- EFSA Panel on Biological Hazards. 2015. "Scientific opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk." *EFSA Journal* 13 (1): 3940.
- Eleopra, R., C. Montecucco, G. Devigili, C. Lettieri, S. Rinaldo, L. Verriello, M. Pirazzini, P. Caccin et O. Rossetto. 2013. "Botulinum neurotoxin serotype D is poorly effective in humans: An in vivo electrophysiological study." *Clinical Neurophysiology* 124 (5): 999-1004. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clinph.2012.11.004>.
- Eleopra, R., V. Tugnoli, O. Rossetto, C. Montecucco et D. De Grandis. 1997. "Botulinum neurotoxin serotype C: a novel effective botulinum toxin therapy in human." *Neuroscience Letters* 224 (2): 91-94. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(97\)13448-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3940(97)13448-6).
- Elwell, M. W. et D. M. Barbano. 2006. "Use of microfiltration to improve fluid milk quality." *J Dairy Sci* 89 Suppl 1: E20-30. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72361-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72361-X).
- Espelund, M. et D. Klaveness. 2014. "Botulism outbreaks in natural environments - an update." *Frontiers in Microbiology* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00287>.
- Espié, E., V. Vaillant, H. d. Valk et M. R. Popoff. 2003. "France recalls internationally distributed halal meat products from the plant implicated as the source of a type B botulism outbreak." *Weekly releases (1997-2007)* 7 (38): 2295. <https://doi.org/doi:https://doi.org/10.2807/esw.07.38.02295-en>.
- FAO/WHO. 2004. *Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant formula. Microbiological Assessment Series 6*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization.
- FAO/WHO. 2007. *Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant formula meeting report. Microbiological risk assessment series 6*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization.
- Fernández, R. A., A. S. Ciccarelli, G. N. Arenas et D. F. Giménez. 1989. "[Type D and A *Clostridium botulinum* in necropsy samples from bovines with "mal de Aguapey"]." *Rev Argent Microbiol* 21 (2): 47-53.
- Fjolstad, M. et T. Klund. 1969. "outbreak of botulism among ruminants in connection with ensilage feeding." *Nord Veterinaermed*.
- Fohler, S., S. Discher, E. Jordan, C. Seyboldt, G. Klein, H. Neubauer, M. Hoedemaker, T. Scheu, A. Campe, K. Charlotte Jensen et A. Abdulmawjood. 2016. "Detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin genes (A-F) in dairy farms from Northern Germany using PCR: A case-control study." *Anaerobe* 39: 97-104. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.03.008>.
- Galey, F. D., R. Terra, R. Walker, J. Adaska, M. A. Etchebarne, B. Puschner, E. Fisher, R. H. Whitlock, T. Rocke, D. Willoughby et E. Tor. 2000. "Type C botulism in dairy cattle from feed contaminated with a dead cat." *J Vet Diagn Invest* 12 (3): 204-9. <https://doi.org/10.1177/104063870001200302>.

- Gauvry, E., A. G. Mathot, I. Leguerinel, O. Couvert, F. Postollec, V. Broussolle et L. Coroller. 2017. "Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment." *Research in Microbiology* 168 (4): 369-378. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.006>.
- Georget, E., B. Miller, M. Callanan, V. Heinz et A. Mathys. 2014. "(Ultra) high pressure homogenization for continuous high pressure sterilization of pumpable foods - a review." *Front Nutr* 1: 15. <https://doi.org/10.3389/fnut.2014.00015>.
- Gésan-Guiziou, G. 2010. "15 - Removal of bacteria, spores and somatic cells from milk by centrifugation and microfiltration techniques." Dans *Improving the Safety and Quality of Milk*, édité par Mansel W. Griffiths, 349-372. : Woodhead Publishing.
- Greenberg, R. A., R. B. Tompkin, B. O. Bladel, R. S. Kittaka et A. Anellis. 1966. "Incidence of mesophilic Clostridium spores in raw pork, beef, and chicken in processing plants in the United States and Canada." *Appl Microbiol* 14 (5): 789-93.
- Guillier, L. 2017. "Analyse des risques microbiologiques " Dans *Risques microbiologiques alimentaires*, édité par Guillier L. Naïtali M, Dubois- Brissonet F, In Sciences et techniques agroalimentaire. Paris: Lavoisier Tech & Doc.
- Guizelini, C. C., R. A. A. Lemos, J. L. P. de Paula, R. C. Pupin, D. C. Gomes, C. S. L. Barros, D. A. Neves, L. O. B. Alcântara, R. O. S. Silva et F. C. F. Lobato. 2019. "Type C botulism outbreak in feedlot cattle fed contaminated corn silage." *Anaerobe* 55: 103-106.
- Hedeland, M., H. Moura, V. Båverud, A. R. Woolfitt, U. Bondesson et J. R. Barr. 2011. "Confirmation of botulism in birds and cattle by the mouse bioassay and Endopep-MS." *Journal of Medical Microbiology* 60 (9): 1299-1305. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/jmm.0.031179-0>.
- Hogg, R., C. Livesey et J. Payne. 2008. "Diagnosis and implications of botulism." *In practice* 30 (7): 392-397.
- Holzer, E. 1962. "Botulism caused by inhalation." *Medizinische Klinik* 57: 1735-1738.
- Hughes, J. M., J. R. Blumenthal, M. H. Merson, G. L. Lombard, V. R. Dowell Jr et E. J. Gangarosa. 1981. "Clinical features of types A and B food-borne botulism." *Annals of Internal Medicine* 95 (4): 442-445.
- Insalata, N. F., S. J. Witzeman, G. J. Fredericks et F. C. Sunga. 1969. "Incidence study of spores of Clostridium botulinum in convenience foods." *Applied microbiology* 17 (4): 542-544.
- Joubert, L., C. Chirol et P. Beaureau. 1969. "Concerning 7 cases of bovine botulism C of feline origin: Epidemiological and pathogenical hypotheses." *Bull. Soc. Sci. Vet. Med. Comp. Lyon* 71: 95-101.
- Karolenko, C. E., A. Bhusal, J. L. Nelson et P. M. Muriana. 2020. "Processing of Biltong (Dried Beef) to Achieve USDA-FSIS 5-log Reduction of Salmonella without a Heat Lethality Step." *Microorganisms* 8 (5): 791.
- Kauiter, D. A., T. Lilly, Jr., H. M. Solomon et R. K. Lynt. 1982. "Clostridium botulinum Spores in Infant Foods: A Survey." *Journal of Food Protection* 45 (11): 1028-1029. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-45.11.1028>.
- Kim, J. et P. M. Foegeding. 1993. "Principles of control " Dans *Clostridium botulinum. Ecology and control in foods*, édité par A. H. W. Hauschild et K. L. Dodds, 121-176. New York: Marcel Dekker
- King, L. A. 2008. "Two severe cases of botulism associated with industrially produced chicken enchiladas, France, August 2008." *Eurosurveillance* 13 (37): 18978.
- King, L. A., T. Niskanen, M. Junnikkala, E. Moilanen, M. Lindström, H. Korkeala, T. Korhonen, M. R. Popoff, C. Mazuet et H. Callon. 2009. "Botulism and hot-smoked whitefish: a

- family cluster of type E botulism in France, September 2009." *Eurosurveillance* 14 (45): 19394.
- King, L. A., M. R. Popoff, C. Mazuet, E. Espié et V. Vaillant. 2010. "Infant botulism in France, 1991-2009." *Archives de pédiatrie: organe officiel de la Société française de pédiatrie* 17 (9): 1288-1292.
- Klarmann, D. 1989. "The detection of *Clostridium botulinum* in fecal samples of cattle and swine and in the raw material and animal meal of different animal body rendering plants." *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 102 (3): 84-86.
- Kudrow, D. B., D. A. Henry, D. A. Haake, G. Marshall et G. E. Mathisen. 1988. "Botulism associated with *Clostridium botulinum* sinusitis after intranasal cocaine abuse." *Annals of internal medicine* 109 (12): 984-985.
- Kummel, J., R. Krametter-Froetscher, G. Six, R. Brunthaler, W. Baumgartner et B. Altenbrunner-Martinek. 2012. "Descriptive study of botulism in an Austrian dairy herd: a case report." *Veterinarni Medicina* 57 (3).
- Kuntz, G., C. Gelin et Y. Villaggi. 2020. "Botulisme en filière bovine : maladie animale et risque santé publique - Retour d'expérience sur la gestion de cas " Journée d'échange sur le botulisme animal, 26 novembre 2020.
- Le Maréchal, C., C. Druilhe, E. Repérant, E. Boscher, S. Rouxel, S. Le Roux, T. Poëzévara, C. Ziebal, C. Houdayer, B. Nagard, F. Barbut, A. M. Pourcher et M. Denis. 2019. "Evaluation of the occurrence of sporulating and nonsporulating pathogenic bacteria in manure and in digestate of five agricultural biogas plants." *MicrobiologyOpen* 8 (10): e872. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mbo3.872>.
- Le Maréchal, C., O. Hulin, S. Macé, C. Chuzeville, S. Rouxel, T. Poëzevara, C. Mazuet, F. Pozet, E. Sellal, L. Martin, A. Viry, C. Rubbens et M. Chemaly. 2019. "A Case Report of a Botulism Outbreak in Beef Cattle Due to the Contamination of Wheat by a Roaming Cat Carcass: From the Suspicion to the Management of the Outbreak." *Animals* 9 (12): 1025.
- Le Maréchal, C., R. Souillard, Y. Villaggi, G. Kuntz, S. Le Bouquin, A. Scalabrino, K. Ayadi-Akrout, F. Mahé, S. Thomas, M. Chemaly et S. Rautureau. 2020. "Botulisme bovin : importance de la biosécurité pour prévenir les contaminations croisées avec les ateliers de volailles." *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* Novembre 2020.
- Le Maréchal, C., C. Woudstra et P. Fach. 2016. *Botulism*. Wiley. ed. *Clostridial Diseases of Animals*, édité par Songer F. A. Uzal, J. G., Prescott, J. F. and Popoff M. R.
- Lindstrom, M., K. Kiviniemi et H. Korkeala. 2006. "Hazard and control of group II (non-proteolytic) *Clostridium botulinum* in modern food processing." *International Journal of Food Microbiology* 108 (1): 92-104. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.003>.
- Lindström, M. et H. Korkeala. 2006. "Laboratory diagnostics of botulism." *Clin Microbiol Rev* 19 (2): 298-314. <https://doi.org/10.1128/cmr.19.2.298-314.2006>.
- Lindström, M., J. Myllykoski, S. Sivelä et H. Korkeala. 2010. "*Clostridium botulinum* in Cattle and Dairy Products." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50 (4): 281-304. <https://doi.org/10.1080/10408390802544405>.
- Lorenzo, J. M. 2014. "Changes on physico-chemical, textural, lipolysis and volatile compounds during the manufacture of dry-cured foal "cecina". " *Meat Science* 96 (1): 256-263. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.06.026>.
- Lund, B. M. 1993. "Quantification of factors affecting the probability of development of pathogenic bacteria, in particular *Clostridium botulinum*, in foods." *Journal of Industrial Microbiology* 12 (3-5): 144-155. <https://doi.org/10.1007/bf01584183>.
- Lund, B. M. et S. Notermans. 1993. "Potential hazards associated with REPFEDS." Dans *Clostridium botulinum. Ecology and Control in Food*, édité par A. H. W. Hauschild et K. L. Dodds, 279-304. New York: Marcel Dekker.

- Lund, B. M. et M. W. Peck. 2013. *Clostridium botulinum*. Edité par R. G. Labbe et S. Garcia. *Guide to Foodborne Pathogens, 2nd Edition*.
- MacDonald, K. L., G. W. Rutherford, S. M. Friedman, J. R. Dietz, B. R. Kaye, G. F. McKinley, J. H. Tenney et M. L. Cohen. 1985. "Botulism and botulism-like illness in chronic drug abusers." *Annals of internal medicine* 102 (5): 616-618.
- Maisons-Alfort, E. N. V. d. 2019. *Dangers sanitaires de 1ère et 2ème catégories chez les ruminants* https://eve.vet-alfort.fr/pluginfile.php/60750/mod_resource/content/0/Poly%20Dangers%20sanitaires%20rum%20juin%202019.pdf (Consulté le 17/04/2020).
- Mazuet, C., P. Bouvet, L. A. King et M. R. Popoff. 2011. "Le botulisme humain en France, 2007–2009." *Bull Epidemiol Hebd* 2011: 49-53.
- Mazuet, C., N. Da Silva Jourdan, C. Legeay, J. Sautereau et R. M. Popoff. 2018. "Le botulisme humain en France, 2013–2016." *Bull. Epidemiol. Hebd* 3: 46-54.
- Mazuet, C., C. Legeay, J. Sautereau, C. Bouchier, A. Criscuolo, P. Bouvet, H. Trehard, N. Da Silva Jourdan et M. Popoff. 2017. "Characterization of *Clostridium baratii* type F strains responsible for an outbreak of botulism linked to beef meat consumption in France." *PLoS currents* 9.
- Mazuet, C., C. Legeay, J. Sautereau, L. Ma, C. Bouchier, P. Bouvet et M. R. Popoff. 2016. "Diversity of Group I and II *Clostridium botulinum* Strains from France Including Recently Identified Subtypes." *Genome biology and evolution* 8 (6): 1643-1660. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw101>.
- Mazuet, C., M. R. Popoff, J. Sautereau, C. Legeay et P. Bouvet. 2014. "Le botulisme humain en France, 2010-2012." *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* (6): 106-114.
- Migaud, M. et J. C. Frenzt. 1978. *La charcuterie crue*. Edité par Ed. Soussana. Orly.
- Moeller, R. B., Jr., B. Puschner, R. L. Walker, T. E. Rocke, S. R. Smith, J. S. Cullor et A. A. Ardans. 2009. "Short communication: Attempts to identify *Clostridium botulinum* toxin in milk from three experimentally intoxicated Holstein cows." *J Dairy Sci* 92 (6): 2529-33. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1919>.
- Moore, R. J. et J. A. Lacey. 2019. "Genomics of the Pathogenic Clostridia." *Microbiol Spectr* 7 (3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0033-2018>.
- Morris, G. J. 2000. "The effect of redox potential." Dans *The Microbiological Quality and Safety of Food. Volume I*, édité par B.M. Lund, A.C. Baird-Parker et G.W. Gould, 235-250. Gaithersburg: Aspen Publishers.
- Myllykoski, J., M. Lindström, R. Keto-Timonen, H. Söderholm, J. Jakala, H. Kallio, A. Sukura et H. Korkeala. 2009. "Type C bovine botulism outbreak due to carcass contaminated non-acidified silage." *Epidemiology & Infection* 137 (2): 284-293.
- Nakamura, K., T. Kohda, K. Umeda, H. Yamamoto, M. Mukamoto et S. Kozaki. 2010. "Characterization of the D/C mosaic neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* associated with bovine botulism in Japan." *Veterinary Microbiology* 140 (1): 147-154. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.023>.
- Neill, S. D., M. F. McLoughlin et S. G. McIlroy. 1989. "Type C botulism in cattle being fed ensiled poultry litter." *Vet Rec* 124 (21): 558-60. <https://doi.org/10.1136/vr.124.21.558>.
- Peck, M. W., K. E. Goodburn, R. P. Betts et S. C. Stringer. 2008. "Assessment of the potential for growth and neurotoxin formation by non-proteolytic *Clostridium botulinum* in short shelf-life commercial foods designed to be stored chilled." *Trends in Food Science & Technology* 19 (4): 207-216. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.12.006>.
- Peck, M. W., T. J. Smith, F. Anniballi, J. W. Austin, L. Bano, M. Bradshaw, P. Cuervo, L. W. Cheng, Y. Derman, B. G. Dorner, A. Fisher, K. K. Hill, S. R. Kalb, H. Korkeala, M. Lindström, F. Lista, C. Lúquez, C. Mazuet, M. Pirazzini, M. R. Popoff, O. Rossetto, A.

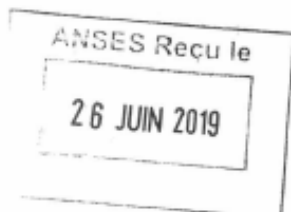
- Rummel, D. Sesardic, B. R. Singh et S. C. Stringer. 2017. "Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature." *Toxins* 9 (1): 38. <https://doi.org/10.3390/toxins9010038>.
- Pegram, P. et S. Stone. 2020. "Botulism." <https://www.uptodate.com/contents/botulism>.
- Pellett, S., W. H. Tepp, J. M. Scherf, C. L. Pier et E. A. Johnson. 2015. "Activity of botulinum neurotoxin type D (strain 1873) in human neurons." *Toxicon* 101: 63-69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.04.015>.
- Peng Chen, Z., J. G. J. Morris, R. L. Rodriguez, A. Wagle Shukla, J. Tapia-Núñez et M. S. Okun. 2012. "Emerging opportunities for serotypes of botulinum neurotoxins." *Toxins* 4 (11): 1196-1222. <https://doi.org/10.3390/toxins4111196>.
- Perrin, F., F. Tenenhaus-Aziza, V. Michel, S. Miszczycha, N. Bel et M. Sanaa. 2015. "Quantitative risk assessment of haemolytic and uremic syndrome linked to O157: H7 and Non-O157: H7 shiga-toxin producing Escherichia coli strains in raw milk soft cheeses." *Risk Analysis* 35 (1): 109-128.
- Pingeon, J. M., C. Vanbockstael, M. R. Popoff, L. A. King, B. Deschamps, G. Pradel, H. Dupont, A. Spanjaard, A. Houdard et C. Mazuet. 2011. "Two outbreaks of botulism associated with consumption of green olive paste, France, September 2011." *Eurosurveillance* 16 (49): 20035.
- Popoff, M. R. 1989. "Revue sur l'épidémiologie du botulisme bovin en France et analyse de sa relation avec les élevages de volailles." *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 8(1): 129-145. <https://doi.org/10.20506/rst.8.1.404>.
- Popoff, M. R. 2017. "*Clostridium botulinum* et autres *Clostridium* producteurs de neurotoxines botuliques." Dans *Risques microbiologiques alimentaires*, édité par M. Naïtali, L. Guillier et F. Dubois-Brissonnet. : Lavoisier
- Popoff, M. R. 2018. "Botulinum Toxins, Diversity, Mode of Action, Epidemiology of Botulism in France " Dans *Botulinum Toxin*, édité par IntechOpen Nikolay Serdev.
- Poulain, B. et M. R. Popoff. 2019. "Why Are Botulinum Neurotoxin-Producing Bacteria So Diverse and Botulinum Neurotoxins So Toxic?" *Toxins (Basel)* 11 (1). <https://doi.org/10.3390/toxins11010034>.
- Prevot, A. R., J. Terrasse, J. Daumail, M. Cavaroc, J. Riol et R. Sillio. 1955. "Existence en France du botulisme humain de type C." *Bull. Acad. Natl. Med.* 139: 355–358.
- Rao, A. K. et S. Maslanka. 2018. "Botulism." Dans *Harrison's Principles of Internal Medicine, 20e*, édité par Anthony S. Fauci J. Larry Jameson, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, Joseph Loscalzo.
- Rasetti-Escargueil, C., E. Lemichez et M. R. Popoff. 2019. "Public Health Risk Associated with Botulism as Foodborne Zoonoses." *Toxins (Basel)* 12 (1). <https://doi.org/10.3390/toxins12010017>.
- Reineke, K. et A. Mathys. 2020. "Endospore Inactivation by Emerging Technologies: A Review of Target Structures and Inactivation Mechanisms." *Annu Rev Food Sci Technol* 11: 255-274. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051632>.
- Relun, A., L. Dorso, A. Douart, C. Chartier, R. Guatteo, C. Mazuet, M. R. Popoff et S. Assié. 2017. "A large outbreak of bovine botulism possibly linked to a massive contamination of grass silage by type D/C *Clostridium botulinum* spores on a farm with dairy and poultry operations." *Epidemiol Infect* 145 (16): 3477-3485. <https://doi.org/10.1017/s0950268817002382>.
- Roberts, T. A. et A. M. Gibson. 1979. "The relevance of *Clostridium botulinum* type C in public health and food processing." *International Journal of Food Science & Technology* 14 (3): 211-226. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb00866.x>.

- Roblot, F., M. Popoff, J. Carlier, C. Godet, P. Abbadie, S. Matthis, A. Eisendorn, G. Le Moal, B. Becq-Giraudon et P. Roblot. 2006. "Botulism in patients who inhale cocaine: the first cases in France." *Clinical Infectious Diseases* 43 (5): e51-e52.
- Roblot, P., F. Roblot, J. L. Fauchère, A. Devilleger, R. Maréchaud, J. P. Breux, G. Grollier et B. Becq-Giraudon. 1994. "Retrospective study of 108 cases of botulism in Poitiers, France." *J Med Microbiol* 40 (6): 379-84. <https://doi.org/10.1099/00222615-40-6-379>.
- Schmid, A., U. Messelhäusser, S. Hörmansdorfer, C. Sauter-Louis et R. Mansfeld. 2013. "Occurrence of zoonotic Clostridia and Yersinia in healthy cattle." *Journal of food protection* 76 (10): 1697-1703.
- Segner, W. P. et C. F. Schmidt. 1971. "Heat resistance of spores of marine and terrestrial strains of Clostridium botulinum type C." *Applied microbiology* 22 (6): 1030-1033.
- Segner, W. P., C. F. Schmidt et J. K. Boltz. 1971. "Minimal growth temperature, sodium chloride tolerance, pH sensitivity, and toxin production of marine and terrestrial strains of Clostridium botulinum Type C " *Applied Microbiology* 22 (6): 1025-&. <https://doi.org/10.1128/aem.22.6.1025-1029.1971>.
- Semenko, N., H. Mokhort, O. Sokolovska, I. Kolesnikova, I. Kuzin et K. Saylor. 2020. "Foodborne Botulism in Ukraine from 1955 to 2018." *Foodborne Pathog Dis*. <https://doi.org/10.1089/fpd.2020.2826>.
- Setlow, P., S. W. Wang et Y. Q. Li. 2017. "Germination of Spores of the Orders Bacillales and Clostridiales." Dans *Annual Review of Microbiology, Vol 71*, édité par S. Gottesman, In *Annual Review of Microbiology*, 459-477.
- Sevenich, R. et A. Mathys. 2018. "Continuous Versus Discontinuous Ultra-High-Pressure Systems for Food Sterilization with Focus on Ultra-High-Pressure Homogenization and High-Pressure Thermal Sterilization: A Review." *Compr Rev Food Sci Food Saf* 17 (3): 646-662. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12348>.
- Seyboldt, C., S. Discher, E. Jordan, H. Neubauer, K. C. Jensen, A. Campe, L. Kreienbrock, T. Scheu, A. Wichern et F. Gundling. 2015. "Occurrence of Clostridium botulinum neurotoxin in chronic disease of dairy cows." *Veterinary microbiology* 177 (3-4): 398-402.
- Siegel, L. S. 1993. "Destruction of Botulinum Toxins in Food and Water " Dans *Clostridium botulinum. Ecology and control in foods*, édité par A. H. W. Haushchild et K. L. Dodds, 323-332. New York: Marcel Dekker
- Snow, D. M., R. R. Cobb, J. Martinez, I. Finger-Baker, L. Collins, S. Terpening, E. S. Syar, N. Niemuth, D. Kobs, R. Barnewall, S. Farr-Jones, J. D. Marks et M. T. Tomic. 2021. "A Monoclonal Antibody Combination against both Serotypes A and B Botulinum Toxin Prevents Inhalational Botulism in a Guinea Pig Model." *Toxins* 13 (1): 31.
- Souillard, R., C. Le Maréchal, V. Ballan, F. Mahé, M. Chemaly et S. Le Bouquin. 2017. "A bovine botulism outbreak associated with a suspected cross-contamination from a poultry farm." *Vet Microbiol* 208: 212-216. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.07.022>.
- Souillard, R., C. Le Maréchal, F. Hollebecque, S. Rouxel, A. Barbé, E. Houard, D. Léon, T. Poëzévara, P. Fach, C. Woudstra, F. Mahé, M. Chemaly et S. Le Bouquin. 2015. "Occurrence of C. botulinum in healthy cattle and their environment following poultry botulism outbreaks in mixed farms." *Vet Microbiol* 180 (1-2): 142-5. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.032>.
- Steinman, A., M. Chaffer, D. Elad et N. Y. Shpigel. 2006. "Quantitative Analysis of Levels of Serum Immunoglobulin G against Botulinum Neurotoxin Type D and Association with Protection in Natural Outbreaks of Cattle Botulism." *Clinical and Vaccine Immunology* 13 (8): 862-868. <https://doi.org/10.1128/cvi.00046-06>.

- Taclindo, C., T. Midura, G. S. Nygaard et H. L. Bodily. 1967. "Examination of Prepared Foods in Plastic Packages for *Clostridium botulinum*." *Applied Microbiology* 15 (2): 426-430.
- Tehran, D. A. et M. Pirazzini. 2018. "Novel Botulinum Neurotoxins: Exploring Underneath the Iceberg Tip." *Toxins* 10 (5): 190.
- Tevell Åberg, A., I. Karlsson et M. Hedeland. 2020. "Modification and validation of the Endopep-mass spectrometry method for botulinum neurotoxin detection in liver samples with application to samples collected during animal botulism outbreaks." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03001-z>.
- Truvé, E., J. Maubois, L., M. Piot, M. Madec, N., J. Fauquant, A. Rouault, J. Tabard et G. Brinkman. 1991. "Retention of various microbial species during milk epuration by cross-flow microfiltration." *Lait* 71 (1): 1-13.
- Van Nieuwenhuysen, T., O. Paerewijck, E. Van de Wouwer, S. Denayer et N. Botteldoorn. 2019. "Extreme bovine botulism type DC outbreak in cattle farm in Belgium." Workshop on risk associated with animal botulism and ANIBOTNET final meeting, Maisons-Alfort.
- Vignola, C. L. et Fondation de Technologie Laitière du Québec. 2002. *Science et technologie du lait : transformation du lait*. Montréal: Presses Internationales Polytechnique.
- Wachnicka, E., S. C. Stringer, G. C. Barker et M. W. Peck. 2016. "Systematic Assessment of Nonproteolytic *Clostridium botulinum* Spores for Heat Resistance." *Appl Environ Microbiol* 82 (19): 6019-29. <https://doi.org/10.1128/aem.01737-16>.
- Wapen, B. D. et L. Gutmann. 1974. "Wound Botulism: A Case Report." *JAMA* 227 (12): 1416-1417. <https://doi.org/10.1001/jama.1974.03230250040030>.
- Weingart, O. G., T. Schreiber, C. Mascher, D. Pauly, M. B. Dorner, T. F. Berger, C. Egger, F. Gessler, M. J. Loessner, M. A. Avondet et B. G. Dorner. 2010. "The case of botulinum toxin in milk: experimental data." *Appl Environ Microbiol* 76 (10): 3293-300. <https://doi.org/10.1128/aem.02937-09>.
- Woudstra, C., H. Skarin, F. Anniballi, L. Fenicia, L. Bano, I. Drigo, M. Koene, M.-H. Bâyon-Auboyer, J.-P. Buffereau et D. De Medici. 2012. "Neurotoxin gene profiling of *Clostridium botulinum* types C and D native to different countries within Europe." *Applied and environmental microbiology* 78 (9): 3120-3127.
- Zhang, S., F. Lebreton, M. J. Mansfield, S. I. Miyashita, J. Zhang, J. A. Schwartzman, L. Tao, G. Masuyer, M. Martínez-Carranza, P. Stenmark, M. S. Gilmore, A. C. Doxey et M. Dong. 2018. "Identification of a Botulinum Neurotoxin-like Toxin in a Commensal Strain of *Enterococcus faecium*." *Cell Host Microbe* 23 (2): 169-176.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.12.018>.

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine



2019-SA-0112



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

Direction générale de l'alimentation
Mission des urgences sanitaires

Le Directeur général de l'alimentation

Suivi par : Lilian Calvo
Tel : 01 49 55 42 34

à

mus.dgal@agriculture.gouv.fr

Monsieur le Directeur Général de l'Agence
nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail

251 rue de Vaugirard
75732 PARIS CEDEX 15

Paris,

25 JUIN 2019

Objet : Mise à jour des connaissances et évaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits dans la filière bovine, lors de suspicion et de confirmation de cas de botulisme.

Conformément aux dispositions de l'article L. 1313-1 et 1313-3 du Code de la santé publique j'ai l'honneur de solliciter l'avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur une demande d'actualisation de connaissances relatives au risque lié à la consommation des produits (lait et viande) potentiellement contaminés par le *C. botulinum* dans la filière bovine.

Les cas de botulisme de type C, D ou mosaïque C et D en élevages de bovin sont fréquents en France avec, dans certains cas, des impacts non négligeables pour l'élevage infecté.

Actuellement en France, le botulisme est classé comme un danger sanitaire de première catégorie pour toutes les espèces sensibles. Et, à ce jour, dans le diagnostic de botulisme animal sont recherchés les types toxiques suivants :

- Volaille : C, D, C/D, D/C et E
- Bovin : C, D, C/D, D/C

En 2002, l'Afssa a publié une évaluation du risque sanitaire relative au risque de transmission à l'homme de *C. botulinum* à partir de la consommation de produits (lait, viande, œufs) à l'état frais et transformé, provenant d'un lot d'animaux atteints de cette maladie, susceptibles de contenir de la neurotoxine et/ ou des formes végétatives ou encore des spores de *C. botulinum* d'animaux malades ou infectés dans les filières aviaire et bovine.

Postérieurement, dans sa réponse à la saisine 2008-SA-0334, l'Afssa s'est prononcée sur des mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre le botulisme aviaire en distinguant notamment des mesures de gestion selon le type de toxine botulinique identifiée

viandes et intestins) issus d'animaux sains, c'est-à-dire en bonne santé, sans signe clinique de maladie voire sans lésion si abattu provenant d'un foyer confirmé de botulisme était également faite.

Toutefois, les informations disponibles ne permettent pas pleinement l'aide à la décision pour la gestion proportionnée de cas de botulisme bovin de type C, D ou mosaïque C et D. Les évaluations existantes répondent qu'en partie au risque de contamination par voie alimentaire et notamment celui du nourrisson, vulnérable à cause de l'immaturité de sa flore digestive qui ne le protège pas contre l'implantation de *C. botulinum*. En effet, l'estimation du risque associé à une exposition par voie alimentaire à partir de la consommation de lait provenant d'un animal atteint de botulisme ou en phase d'incubation, n'est pas aujourd'hui caractérisée. De ce fait, les mesures de gestion, notamment sur les produits laitiers, sont assez conservatrices lors de botulisme (de type C, D ou mosaïque C et D) par principe de précaution.

Dans ce contexte, il nous apparaît nécessaire de soumettre les questions listées ci-dessous qui visent à compléter et à actualiser les préconisations émises dans les avis précédents. **Cette évaluation concerne le botulisme bovin de type C ou D ou mosaïque (C/D, D/C) et tout autre sérotype qui serait pertinent en termes d'évaluation de la santé publique dans cette filière. Si des spécificités sont mises en évidence pour les DROM, il est demandé de les traiter dans un 2^e temps.**

- Quel est le risque pour l'homme lié à la consommation de produits carnés ou laitiers provenant d'un bovin en incubation ou atteint de botulisme ? Le risque est-il différent selon les souches bactériennes et la population concernée (nourrissons, enfants, adultes, personnes fragiles, ...) ? Comment l'état de santé des animaux influence-t-il le risque pour le consommateur final (importance relative entre la phase d'incubation et la phase clinique) ?
- Quel est le risque potentiel associé aux produits carnés et laitiers issus des autres animaux du troupeau que ceux strictement malades ? Existe-t-il des moyens pour diminuer ce risque de contamination des produits ?
- La manipulation de carcasses en abattoir issues d'un animal d'un lot de bovins atteints de botulisme mais dépourvu de signes cliniques (l'animal malade étant bien évidemment exclu), présente-t-elle un risque pour les employés de contracter le botulisme ? Comment le maîtriser ?
- Quelle est l'efficacité des différents traitements du lait sur les formes végétatives et sporulées ? Dans quelle mesure peuvent-ils être considérés comme assainissants ?
 - pasteurisation
 - traitement UHT
 - bactérifugation
 - filtration membranaire

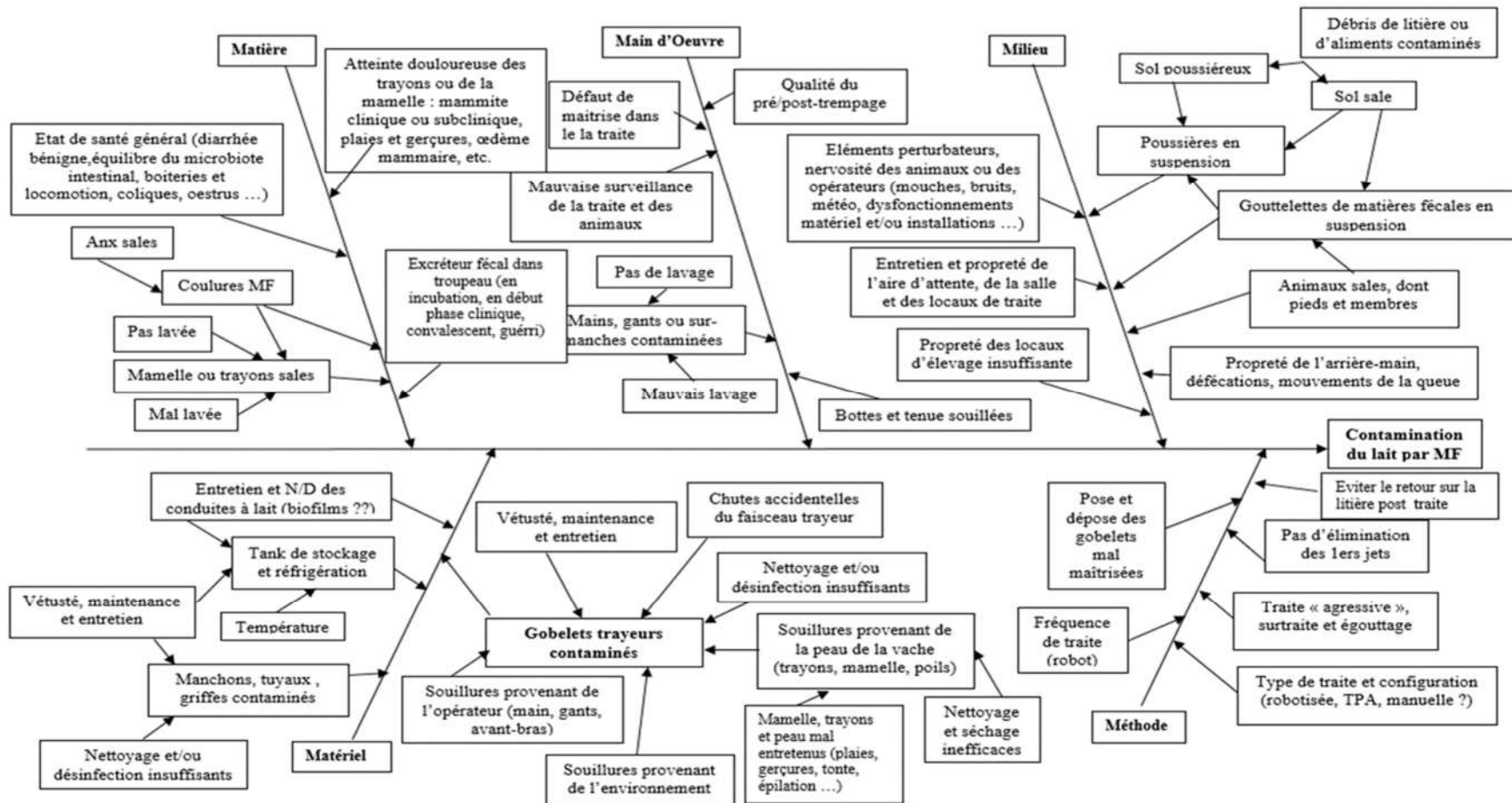
Je vous remercie de bien vouloir apporter votre réponse d'ici le 30 mai 2020.



Le Directeur Général de l'Alimentation

Bruno FERREIRA

Annexe 2 : Diagramme de détermination des causes de Contamination du lait par les matières fécales (MF) des bovins lors de la traite



Annexe 3 : Distribution des niveaux de contamination dans les matières fécales estimée à partir de la prévalence observée

La figure 17 montre les niveaux de contamination dans les matières fécales estimée par le GT à partir des données de prévalence dans une ferme concernée par le portage asymptomatique (Souillard *et al.* 2015). Cette figure concerne les estimations de la concentration dans les matières fécales pour une prévalence de 3 bovins parmi 32 et une limite de détection de 1 000 ufc/g.

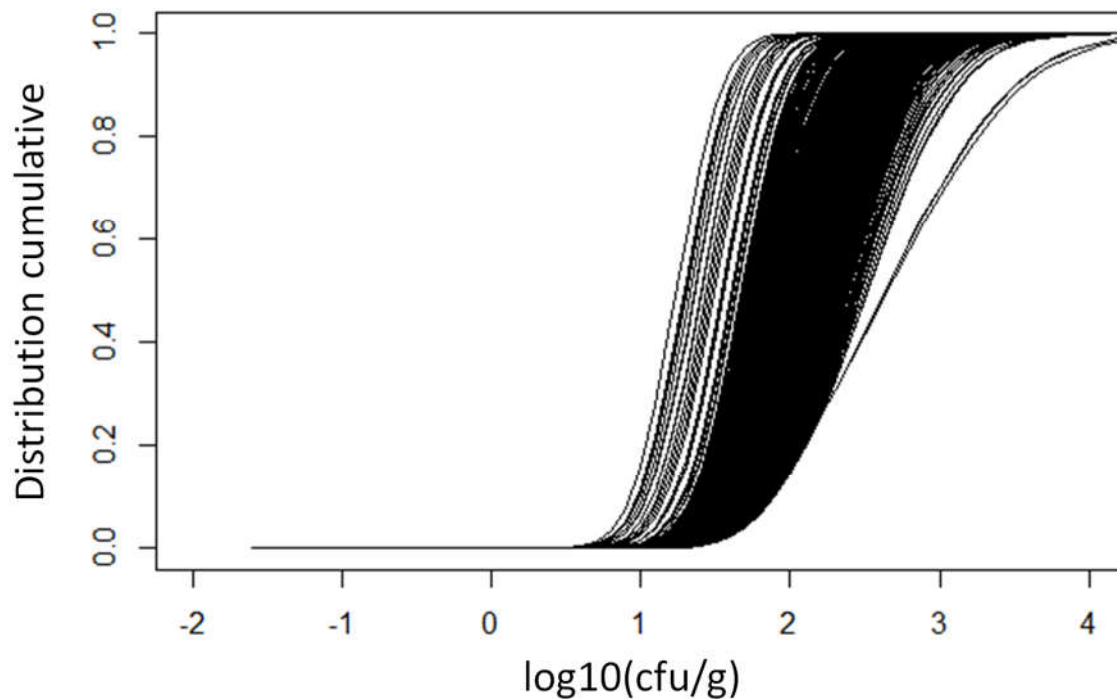


Figure 17. Distribution cumulative des niveaux de contamination estimée à partir de la prévalence observée par une méthode de détection avec une limite de détection de 1000 ufc/g dans une prise d'essai de 25g. Les différentes courbes représentent l'incertitude sur les niveaux de contamination en association avec l'incertitude sur l'estimation de la variabilité de la contamination.

Annexe 4 : ANALYSE DES INCERTITUDES

Un recensement des sources d'incertitudes liées au *corpus* de connaissances a été réalisé dans le GT socle, en se basant sur les recommandations proposées par le groupe de travail « Méthodologie en évaluation des risques » (Anses 2017).

Le tableau suivant présente les principales sources d'incertitudes liées à la méthode d'évaluation (données sélectionnées, méthodes d'intégration des données et interprétation des résultats) et les modalités de leur prise en compte par le GT.

Thématique de l'expertise	Sources d'incertitudes	Prise en compte/ appréciation par le GT	Impact sur les résultats de l'évaluation	
			Direction	Amplitude
Présence et concentration dans les produits et tissus animaux	Physiopathologie du botulisme bovin Cinétique de la toxine dans l'organisme (animal) / interaction toxine/hôte Peu de données relatives à des recherches dans les prélèvements autres que le foie, le sérum et le contenu du TD, en particulier pour des animaux sans signes cliniques Incertitudes sur les caractéristiques et la qualité des méthodes analytiques utilisées dans certaines études expérimentales en botulisme bovin Pour le lait cru, estimation indirecte de la concentration en <i>C. botulinum</i> à partir de la quantité de matières fécales apportées au cours de la traite et la concentration dans les fèces. (utilisation de deux études).	Évaluation qualitative - le GT a considéré que la possibilité/intensité de présence de <i>C. botulinum</i> dans les tissus d'un bovin en fin d'incubation s'apparente à ce qui est observé chez des animaux en début d'apparition de signes cliniques, sauf pour la toxine libre circulante. Analyse de sensibilité - Prise en compte de la situation la plus défavorable (50 % animaux porteurs, LOD = 3000 ufc/g).	Sur-estimation	Non qualifiable
	Manque de données sur la possibilité d'une bactériémie post abattage / transfert chez les bovins Absence de connaissance sur le devenir de la toxine dans le muscle (viande) Manque de données récentes sur l'impact des procédés de préservation des aliments sur les types C et D.	La bactériémie ne peut être exclue mais si elle intervient, il s'agit d'un événement particulièrement rare. L'évolution <i>post mortem</i> du muscle met en œuvre une série de processus enzymatiques (protéases d'origine lysosomiale essentiellement) qui pourraient être de nature à inactiver ou réduire la réduction de l'activité des toxines botuliques résiduelles. En l'absence de données, prise en compte des données disponibles pour les types A et B de <i>C. botulinum</i> ou d'autres	Non qualifiable Sous-estimation Non qualifiable	Non qualifiable Non qualifiable Non qualifiable

Thématique de l'expertise	Sources d'incertitudes	Prise en compte/ appréciation par le GT	Impact sur les résultats de l'évaluation	
			Direction	Amplitude
	Les incertitudes associées aux valeurs de type D retrouvées dans la littérature.	bactéries (formes végétatives ou sporulées)		
	Manque d'informations concernant l'inactivation des toxines (pas de consensus précis pour définir le couple temps-température par exemple, en fonction de la méthodologie d'analyse)	Couple temps/température retenu pour l'inactivation totale des toxines C et D : 90 °C/ 2 min (supérieur à ce qui est préconisé pour les toxines de types A et B 70 °C/ 2 min)	Sur-estimation	Non qualifiable

Notes



anses

CONNAÎTRE, ÉVALUER, PROTÉGER

AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE
de l'alimentation, de l'environnement et du travail

14 rue Pierre et Marie Curie 94701 Maisons-Alfort Cedex
Tél : 01 42 76 40 40
www.anses.fr — @Anses_fr