

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 26 septembre 2014

**AVIS**  
**de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,**  
**de l'environnement et du travail**  
**relatif à « la création d'un nouveau groupe fonctionnel d'additifs**  
**« décontaminants des aliments pour animaux »<sup>1</sup>**

---

*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 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 rendus publics.*

---

L'Anses a été saisie le 5 février 2014 par la DGCCRF pour évaluer l'impact de la création d'un nouveau groupe fonctionnel d'additifs « décontaminants des aliments pour animaux ».

La DGCCRF sollicite l'avis de l'Anses sur l'impact de la création de ce nouveau groupe fonctionnel, sur la santé humaine, la santé animale et pour l'environnement. Elle souhaite en particulier connaître l'avis de l'Anses sur :

- l'efficacité qui peut être attendue de ce type de produit au regard de l'objectif affiché de diminution de la contamination des aliments pour animaux par des salmonelles ;
- les conséquences envisageables de l'utilisation de ce type de produit en termes de développement de résistance des micro-organismes nuisibles ;
- l'impact pour la santé animale, la santé humaine et l'environnement de ce nouveau groupe, compte tenu en particulier des autres produits déjà utilisés (additifs conservateurs, biocides,...).

Selon la saisine, à titre d'exemple, les additifs que souhaiteraient voir autoriser les professionnels comme décontaminants des aliments pour animaux comporteraient le formaldéhyde, les acides organiques et certaines huiles essentielles.

---

<sup>1</sup> annule et remplace l'avis du 27 juin 2014 non publié (Voir annexe 2)

## 1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Les produits de décontamination des aliments pour animaux étaient auparavant intégrés dans la réglementation relative aux produits biocides, en étant prévus dans le type de produits 20<sup>2</sup>. Ce dernier a été supprimé des types de produits pouvant être autorisés comme biocides dans le règlement (UE) n° 528/2012<sup>3</sup>. Par ailleurs, seuls les additifs ayant une fonction de conservateurs<sup>4</sup> sont autorisés en alimentation animale, à l'exclusion des produits ayant une fonction biocide<sup>5</sup>.

Il n'est donc pas possible actuellement d'ajouter des produits ayant un effet décontaminant à des aliments pour animaux, hors du cadre exceptionnel de la gestion des produits non-conformes dans le cas d'une alerte.

Suite à la demande de plusieurs fabricants d'additifs pour l'alimentation animale, la Commission européenne a indiqué qu'elle envisageait de proposer la création d'un nouveau groupe fonctionnel d'additifs. Ce nouveau groupe, qui appartiendrait à la catégorie des additifs technologiques, aurait pour fonction de décontaminer les aliments pour animaux. A noter que les produits utilisés pour désinfecter l'eau potable destinée à la consommation humaine sont quant à eux couverts par la réglementation relative aux biocides et ne pourront pas être autorisés *via* ce nouveau groupe (Type de produit 5, annexe V du règlement (UE) n° 528/2012). La saisine ne porte pas sur une évaluation de la sécurité de chacun des produits qui sera réalisée le cas échéant au cas par cas par l'EFSA, en cas de création du nouveau groupe fonctionnel.

## 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'Anses a confié au comité d'experts spécialisé (CES) « Alimentation animale » l'instruction de cette saisine.

Elle s'est appuyée sur les rapports initiaux de quatre rapporteurs du CES ALAN et d'un rapporteur du CES BIORISK. L'analyse et les conclusions du CES ont été validées lors de sa réunion du 13 mai 2014.

La question telle qu'indiquée dans la dénomination du groupe fonctionnel d'additif « décontamination des aliments pour animaux » est très large : elle a été restreinte dans l'examen de la saisine à la décontamination des aliments vis-à-vis salmonelles.

L'expertise s'est en outre focalisée sur les produits cités dans la saisine : le formaldéhyde, les acides organiques et les huiles essentielles. Elle s'est appuyée sur l'analyse de la bibliographie concernant leur efficacité, leur impact sur la santé animale, la santé humaine et l'environnement ainsi que les conséquences envisageables de l'utilisation de ce type de produit en termes de développement de résistance des micro-organismes nuisibles, en particulier les salmonelles.

<sup>2</sup> Type de produits 20 : produits de protection pour les denrées alimentaires ou les aliments pour animaux, produits utilisés pour protéger les denrées alimentaires et les aliments pour animaux par la lutte contre les organismes nuisibles (annexe V de la directive 98/8/CE du Parlement européen et du Conseil du 16 février 1998 concernant la mise sur le marché des produits biocides. Cette directive a été abrogée par l'article 96 du règlement (UE) n° 528/2012 du 22 mai 2012

<sup>3</sup> Règlement (UE) n° 528/2012 du Parlement Européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides

<sup>4</sup> Protection des aliments pour animaux des altérations dues aux microorganismes ou à leurs métabolites (annexe I du règlement (CE) n° 1831/2003 du 22 septembre modifié

<sup>5</sup> Toute substance ou tout mélange, sous la forme dans laquelle il est livré à l'utilisateur, constitué d'une ou plusieurs substances actives, en contenant ou en générant, qui est destiné à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière par une action autre qu'une simple action physique ou mécanique

### 3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

#### 1- Contexte sur la présence de *Salmonella*

##### a. Introduction

*Salmonella* est encore aujourd'hui un agent zoonotique d'intérêt majeur dans les filières de productions animales. La première raison est la part de cette bactérie zoonotique dans les toxi-infections d'origines alimentaires et particulièrement dans leur forme collective (TIAC). La majorité des TIAC reste en effet associée à *Salmonella* comme le confirment les programmes de surveillance épidémiologique. Les vecteurs identifiés sont principalement les produits animaux et les denrées d'origine animale (DAOA), notamment d'origine avicole (les œufs et les denrées en contenant). Au-delà d'une préoccupation de santé publique, pour les industriels, la maîtrise de *Salmonella* est aujourd'hui également considérée comme un indicateur d'assurance de la qualité des productions de DAOA (Œufs). En effet, à l'absence de la bactérie sur le produit final, critère de sécurité, vient s'ajouter l'exigence de la démonstration de la maîtrise de *Salmonella*, en particulier au cours du procédé d'abattage, tant aux États-Unis (critères maximums dits MEGAREG directive FSIS 10,250.1 du 20 septembre 2013 qui accordent une tolérance de 7,5% sur les carcasses de volaille et de 8,7% pour celles de porc), qu'en Europe (règlement (CE) n° 2073/2005 : tolérances en volaille de 4,6%<sup>6</sup> et en porc de 10%). En Europe, la maîtrise de *Salmonella* en production primaire (volaille et porc) est imposée par le règlement (CE) n° 2160/2003. Ce règlement prévoit l'approbation de programmes spécifiques de contrôle établis par les Etats membres et les exploitations des secteurs de l'alimentation humaine et de l'alimentation animale (article 1<sup>er</sup> paragraphe 2, point b).

Au niveau de l'élevage, de nombreuses études ont identifié les conditions de production favorables à l'absence de la bactérie. La synthèse de ces travaux permet de discuter du rôle de l'aliment par lui-même en tant que facteur de risque de présence de *Salmonella* en élevage. La fabrication, le mode de distribution, la composition, la forme de l'aliment constituent autant de pistes à explorer comme leviers spécifiques pour la maîtrise de ce pathogène en élevage. De plus, l'aliment peut être le véhicule de différents types d'additifs spécifiques dont les vertus préventives et/ou curatives vis-à-vis de *Salmonella*, directement au niveau du tractus digestif, sont en cours d'étude ou d'évaluation. L'objectif du présent document est restreint à la discussion de l'opportunité d'utiliser des acides organiques, certaines huiles essentielles ou le formaldéhyde pour décontaminer des aliments pour animaux et ainsi prévenir l'introduction de *Salmonella* par cet intrant incontournable de la production.

##### b. Quand on parle des *Salmonella*

*Salmonella* (genre) est une bactérie de la famille des entérobactéries. Par bien des aspects, *Salmonella* présente des caractères de résistance aux stress environnementaux équivalents à ceux de *E. coli* et, par extension, à bien des entérobactéries, ce qui permet de considérer les informations disponibles pour ces dernières comme pertinentes pour *Salmonella*.

S'il existe seulement deux espèces de *Salmonella* (*S. enterica* et *S. bongori*) (Grimont, 2007), l'espèce *Salmonella enterica* concentre la majorité des intérêts tant en santé animale qu'en hygiène alimentaire. Au sein de cette espèce, six sous-espèces sont identifiées, et parmi elles, la sous-espèce *enterica* qui est associée à une très large proportion des cas humains. Le faible pourcentage restant représente principalement la sous-espèce *S. enterica subsp. arizonae*, à fort tropisme pour les animaux exotiques à sang froid et qui a fait son apparition dans les tableaux des rapports de cas des zoonoses à la faveur de l'adoption de ces reptiles en tant que nouveaux animaux de compagnie (NAC). Lorsqu'on restreint le champ d'investigation à

<sup>6</sup> Correspond à 7 échantillons composites de 3 peaux de cou pour 50 échantillons analysés.

*Salmonella enterica subsp. enterica*, on ouvre encore cependant la possibilité de rencontrer plus de 1500 sérovars (Grimont, 2007). A titre d'exemple, les *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis* font partie de cette subdivision. Si on s'attend, à ce niveau de précision taxonomique, à retrouver des bactéries très semblables phénotypiquement, il n'en reste pas moins que certains de ces sérovars peuvent être strictement associés à une pathologie animale (*S. Choleraesuis*, *S. Gallinarum*) et n'entrent pas dans le champ d'analyse de la présente étude. D'autres peuvent être pathogènes pour de nombreuses espèces animales, y compris l'homme, et sont considérées comme ubiquistes et particulièrement à contrôler dans le cadre qui nous intéresse : la maîtrise des *Salmonella* depuis l'élevage jusqu'à l'homme par voie alimentaire.

La pathogénicité de *Salmonella* a été plus particulièrement étudiée. Certaines revues de la littérature sur ce sujet relèvent, même au niveau taxonomique qu'est celui du sérovar, la grande variabilité phénotypique à laquelle les recherches sur *Salmonella* sont confrontées (Lianou et Koutsoumani, 2013). Alors, lorsque les acides organiques, huiles essentielles ou formaldéhyde présenteront des actions très spécifiques sur des éléments de cette pathogénicité, ils seront particulièrement soulignés en complément des informations issues des indicateurs que sont *E. coli* ou des entérobactéries.

### c. Réalité de la contamination des aliments pour animaux

Sur une échelle de temps limitée, les sérovars retrouvés dans les matières premières entrant dans la composition des aliments pour animaux sont souvent différents de ceux isolés des animaux de rente (Papadopoulou, 2006 ; Wierup, 2010). Ainsi, pour une année d'analyse en Suède (Wierup, 2010), seuls 4 des 38 sérovars isolés sur les aliments font partie des 10 sérovars prédominants chez l'homme. Cette observation est soulignée également dans les rapports de la FDA aux USA (Li, 2012) qui montrent que seuls 9 des 25 sérovars les plus fréquemment retrouvés dans les matières premières ou les aliments pour animaux (cette étude incluait le pet food) sont les mêmes que ceux retrouvés dans les cas humains de salmonellose.

Il n'en reste pas moins que sur 12 années d'analyse, ce sont 79% des sérovars qui sont communs (Wierup, 2010). De plus, les études anciennes (Clarke, 1973; Lee, 1974) démontraient des entrées de sérovars exotiques dans la chaîne alimentaire par les matières premières d'aliment du bétail. Des illustrations plus récentes de ce phénomène (Hoszowski, 2001) confirment encore le fait que l'aliment reste une source importante d'entrée. Cette réalité (la contamination de l'aliment et son rôle de pourvoyeur de *Salmonella*), se révèle d'autant plus dans des contextes de production où les paramètres d'hygiène sont maîtrisés (Davies, 2010). Sinon, la compétition avec les sérovars endémiques peut dissimuler cette circulation au niveau de l'alimentation (Alvares *et al.*, 2003 ; Hoszowski, 2002). Dans la mesure où des programmes de maîtrise spécifiques pour les filières de production se mettent en place (règlement (CE) n° 2160/2003) au niveau communautaire, une meilleure maîtrise des cycles de contamination/recontamination entre animaux est attendue. Une fois cette dernière atteinte, par les mesures sanitaires, la lutte contre une entrée de *Salmonella* par un aliment redevient un levier prioritaire. L'analyse quantitative du risque confirme cet intérêt de maîtriser *Salmonella* dans l'alimentation des animaux (EFSA, 2010 ; EFSA, 2008).

### d. Place de l'aliment dans la contamination ou le maintien de la contamination des animaux dans un élevage. L'hygiène et la biosécurité

Les filières « ponte » d'œufs de consommation ou de reproduction ont été amenées à traiter le problème des *Salmonella* de façon drastique car cette production a été confrontée dès 1979 à l'émergence d'un sérovar très spécifique et fortement pathogène, *Salmonella* Enteritidis. Les approches basées sur l'hygiène et la biosécurité ont montré un réel succès dans la lutte contre *Salmonella*. Les études de prévalence décrivent en 2006 des situations opposées entre Etats membres, avec des prévalences nationales variant de 0 à 80% de troupeaux positifs (EFSA, 2006). Cette étude souligne la part du « sanitaire » dans le statut des troupeaux vis-à-vis de *Salmonella*. En effet, il faut noter que les Etats membres qui se sont dotés de programmes de

maîtrise de *Salmonella* et les appliquent, présentent des prévalences faibles (EFSA, 2006). Ces programmes s'appuient sur des protocoles de détection de la contamination très sensibles, dès l'étape de sélection génétique, et prévoient en cas de positivité des dispositions allant jusqu'à l'éradication du troupeau. Certains Etats membres incluent dans leur stratégie de maîtrise une gestion stricte du risque de contamination dès la production d'aliments pour animaux associée à des mesures de biosécurité (Suède, Finlande) ; ces pays présentent les prévalences nationales parmi les plus faibles (EFSA, 2006).

Pour les filières de production de chair, les résultats disponibles sont surtout ceux issus de travaux de recherche. Ils permettent d'établir les facteurs de risques de contamination d'un lot de poulet par *Salmonella* avant même l'arrivée des poussins ou en cours de production (Rose *et al.*, 1999, Rose *et al.*, 2003). Ces facteurs de risque sont très clairement associés aux niveaux d'hygiène et de biosécurité appliqués. A ce titre, une étude révèle que le fait que le camion fournisseur d'aliment transite dans l'élevage en passant devant le sas sanitaire de l'élevage est associé à un risque plus élevé (2,7 fois) de statut positif du lot de poulets avant le départ vers l'abattoir (Rose *et al.*, 1999). En complément, dans cette étude, la présentation de l'aliment distribué le 1<sup>er</sup> jour apparaît comme un facteur de risque significatif d'excrétion de *Salmonella* par les oiseaux à la fin de la production (1,5 fois plus avec de la farine par rapport à un aliment granulé). Comme une illustration de la validité de ces résultats, les pays qui ont mis en place des programmes appliquant ces mesures strictes sont encore les mieux placés dans les enquêtes de prévalence européennes comparatives (Suède, Finlande et Danemark, EFSA, 2007).

En filière porcine, les enquêtes révélant les facteurs de risque d'excrétion de la bactérie ou de séroconversion, que ce soit pour des élevages naisseurs, engraisseurs ou multisites, identifient comme prioritaire, dans une stratégie de maîtrise, la mise en place de démarches basées sur l'hygiène et la biosécurité : rupture des cycles de recontamination par des étapes de nettoyage et désinfection efficaces, durée du vide sanitaire, conduite en bandes strictes (Beloil, 2004 ; Letellier, 2000). Aujourd'hui, quelques exemples illustrent des succès de maîtrise au niveau de l'élevage par des stratégies volontaristes et intégrées depuis la sélection des futurs reproducteurs (Ménard, 2009). Dans un élevage naisseur-engraisseur en France, le principal risque de produire des lots excréteurs de *Salmonella* avant abattage est l'absence de préoccupation hygiénique en maternité (Beloil, 2004). Au-delà du respect des bonnes pratiques d'hygiène et de l'application des mesures de biosécurité, l'entrée d'un aliment contaminé dans l'élevage reste un facteur de risque.

En production porcine, les études épidémiologiques (Smith *et al.*, 2010 ; Beloil *et al.*, 2004) complétées par des analyses quantitatives du risque (EFSA, 2010) soulignent également le rôle de levier que peut jouer l'alimentation pour contrer *Salmonella* en élevage. Ainsi, le mode de distribution, mais aussi la composition de l'aliment ou le nombre de transitions alimentaires sont à prendre en compte. Une alimentation sous forme de soupe est protectrice (Beloil *et al.*, 2004), d'autant plus qu'elle est sous forme fermentée (Joris *et al.*, 2010) (la concentration en acides gras volatils y est alors importante) et à forte teneur en orge (Smith *et al.*, 2010).

#### **e. Matières premières plus ou moins contaminées**

Dans le contexte de mondialisation des marchés de distribution des matières premières, les données des rares pays qui réalisent une surveillance permettent d'avoir une image de la contamination par *Salmonella* des matières premières, dépendant des conditions d'échantillonnage variables en fonction du temps et des pays considérés. Les farines de soja (14,6%), de colza (10%) et de maïs (9%) doivent être considérées (Wierup, 2010). Les protéines animales étaient initialement très concernées (jusqu'à 5% de positif en 1993) ; elles ne montraient plus en 2006 qu'environ 2,5% de contamination selon les études de Papadopoulou (Papadopoulou *et al.*, 2009). Cependant, considérant la part de l'incorporation des farines de viande et d'os dans l'aliment, leur impact était considéré comme faible par rapport aux farines de poisson ou de soja (Brooks, 1991). Plus récemment, les données

recueillies par l'EFSA/ECDC (EFSA, 2012) indiquent un faible niveau de contamination des aliments composés (0,5% sur 10 000 échantillons issus de 16 Etats membres en 2010) et une contamination stable (1% sur 15 000 échantillons de 15 Etats membres en 2009). L'étude de Papadopoulou *et al.* (2009) souligne également une évolution favorable des niveaux de contamination des matières premières depuis 1993, avec une diminution régulière jusqu'en 2008, date à partir de laquelle, selon DEFRA, une augmentation forte et rapide conduit à retrouver en 2009 les niveaux de contamination qui étaient ceux de 1993 (autour de 5%). L'analyse EFSA (2012) trouve également une nette augmentation de la contamination des farines de poissons entre 2009 et 2010 (de 0,7 à 9,1%), (cf. annexe 1). L'approvisionnement en matières premières n'est pas sécurisé vis-à-vis de la contamination par *Salmonella*.

L'approvisionnement en aliments ne se cantonne pas à la production d'aliments complets en usine. Une partie de la production est fabriquée à la ferme (FAF). Le risque d'une présence de *Salmonella* dans les aliments FAF était considéré *a priori* comme faible par les experts (EFSA, 2008), ces derniers recommandaient néanmoins des études pour mieux documenter cette position. Un travail récent indique au contraire un plus grand risque de présence de *Salmonella* dans les aliments FAF par rapport à ceux issus d'installations éloignées de la production : grandes usines de fabrication d'aliments (Davies et Wales, 2013). Aux USA, un programme de surveillance existe pour les secteurs de l'alimentation des animaux (FDA *Salmonella* assignment program). Le rapport de ce programme indique une prévalence de 5,7% (10/180) pendant la période 2007-2009, à partir d'échantillons de 200 g (pool de 20 sous-échantillons de 10 g), pour les aliments complets destinés aux animaux de rente, sans distinction d'espèce (Li *et al.*, 2012).

## Conclusion

Les informations issues de la surveillance et de la recherche convergent. Toutes espèces confondues, et en tenant compte des spécificités de chaque filière de production, notamment pour la difficulté de maîtrise des cycles de contamination/recontamination, c'est la maîtrise de l'hygiène et de la biosécurité qui constitue le levier le plus puissant pour maîtriser la présence de *Salmonella* chez les animaux en production. Mais, de façon complémentaire, l'aliment, au moins en tant qu'intrant obligatoire dans l'élevage, reste une source de contamination, particulièrement pour un élevage ayant atteint un haut niveau de pratiques sanitaires et de biosécurité (EFSA, 2010).

## 2- Efficacité de la décontamination des aliments pour animaux avec les produits identifiés dans la saisine vis-à-vis du risque Salmonelle en particulier

### a. Concernant les acides organiques

#### i. Efficacité des différents acides

Les acides organiques sont des acides carboxyliques à chaîne carbonée plus ou moins longue. Il faut noter que les acides sont rarement utilisés seuls, mais plutôt en mélange et sous différentes formes : solide (sels de calcium, de sodium ou d'ammonium), liquide ou encore sous une forme encapsulée pour une libération dans le tube digestif (Wales *et al.*, 2013). Cette dernière étant limitée à des actions chez l'animal ne peut prétendre à un effet décontaminant de l'aliment.

Les études comparant l'efficacité des acides selon la longueur des chaînes carbonées laissent entendre que *Salmonella* serait plus sensible aux *acides gras* à chaîne moyenne (MCFA : medium chain fatty acids), mais les auteurs soulignent qu'il faut bien différencier un effet qui ne serait que bactériostatique d'une action bactéricide définitive (Van Immerseel *et al.*, 2003; Van

Immersseel *et al.*, 2004). L'effet bactéricide est démontré pour des acides en C10 et C12 (Sprong *et al.*, 2001).

Le traitement par des acides peut être envisagé dans les matières premières ou dans l'aliment fini. Le traitement peut être appliqué par nébulisation ou adsorption à un support inerte pour des liquides, ou par incorporation sous forme de poudre (sels d'acide). Les quantités incorporées dépendent du produit et de la forme, mais en général, les taux maximums proposés par les fabricants d'aliment sont inférieurs à 1%. Au-delà, des problèmes d'appétence, voire d'oxydation des installations de l'usine d'aliment, sont rapportés (Adams, 1991, cité par Wales *et al.*, 2013).

## ii. Mode d'action

A pH physiologique, ces molécules participent au métabolisme des bactéries (sources de carbone et d'énergie) (Clark et Cronan, 2005). Mais à pH bas (en dessous de la valeur du  $pK_a$ ), ces acides se présentent sous une forme non dissociée. C'est sous cette forme qu'ils exercent leur activité antimicrobienne. Cette dernière serait due à la capacité de diffusion au travers des membranes bactériennes. Dans le cytoplasme, plus alcalin (Kashket, 1987), il y a dissociation en proton et forme anionique (dite dissociée). La toxicité serait due à l'accumulation des anions, ce qui expliquerait les acidotolérances différentes observées entre espèces (Koyuncu *et al.*, 2013) ou entre souches bactériennes (Berk *et al.*, 2005, Shah *et al.*, 2012). Les formes anioniques dissociées ne diffusent pas au travers de la membrane, elles s'accumulent dans le cytoplasme et perturbent ainsi le fonctionnement de la bactérie avec une intensité variable selon les espèces (Hsiao et Siebert, 1999.). Ces perturbations vont de l'augmentation de la pression osmotique à des inhibitions plus spécifiques de voies métaboliques (désamination des acides aminés) (Flythe et Russell, 2006) et de synthèse des macromolécules (ADN et membrane) (Cherrington *et al.*, 1990).

Certaines actions spécifiques des acides organiques sur *Salmonella* viennent compléter ce portrait général de la toxicité des acides organiques. Dès 1999, Durant *et al* ont observé des changements de concentration en acides gras volatils dans l'environnement de *Salmonella* qui étaient associés à une modulation de ses capacités de colonisation des oiseaux. Cette action s'expliquerait plus spécifiquement par l'inhibition de la transcription des facteurs de régulation portés par le SPI-1, îlot de pathogénicité de *Salmonella* qui est mis en œuvre dès les premières étapes de la pathogénicité (Durant *et al.*, 2000).

La variabilité entre espèces, voire entre souches de *Salmonella* (Berk *et al.*, 2005, Shah *et al.*, 2012, Andino *et al.*, 2014), pour la sensibilité des bactéries face à l'action des acides organiques a été décrite. Un paramètre supplémentaire, important à intégrer dans la perception de l'efficacité d'un traitement par un acide organique à faibles concentrations dans un aliment, est l'induction d'une acidotolérance de la souche (Rishi et Ricke, 2007). Cette acidotolérance renforce clairement la résistance de la bactérie à des stress environnementaux subséquents, incluant la résistance au stress acide de l'estomac (Fratamico *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2012). Et même s'il est suggéré que cette résistance finalement ne donne pas un avantage significatif lors de co-infections massives avec des souches non adaptées (Calhoun et Kwon, 2010), dans les conditions observées en production animale, cet avantage peut être décisif. De plus, il est suggéré que la concentration iléale en acides organiques va conditionner la virulence de la bactérie dans l'intestin (Van Immerseel *et al.*, 2004a; Lawhon *et al.*, 2012). La perturbation par ajout de ces molécules dans l'aliment ou par adaptation de la bactérie doit être considérée avant d'attribuer un rôle favorable aux acides.

## iii. Paramètres utilisés pour mesurer leur efficacité et facteurs influençant

En France, l'arrêté du 23 avril 2007 de la DGAL (modifié par l'arrêté du 31 octobre 2012) précise que « *Les aliments composés distribués aux reproducteurs de l'espèce Gallus gallus subissent un traitement validé comme garantissant une réduction minimale de la contamination*

*microbienne d'entérobactéries de 3 Log UFC/g*». Les dispositions du plan HACCP mis en place dans l'usine doivent permettre de garantir un dénombrement d'entérobactéries inférieur à  $10^3$  UFC/g lors du chargement du camion (seuil de non-conformité) et impose la mise en place de mesures correctives pour les dénombrements supérieurs à 2 Log UFC/g. Ainsi, on dispose de 2 valeurs cibles pour la qualification d'un aliment conforme. Si un traitement alternatif aux traitements physiques devait être envisagé, ce sont ces critères d'efficacité qui seraient considérés.

Au regard de la difficulté de travailler sur un aliment naturellement contaminé à des taux permettant le dénombrement de *Salmonella* (EFSA, 2012), on comprend que les études visant à déterminer les paramètres qui devront être caractérisés pour qualifier un traitement efficace contre *Salmonella* doivent également s'appuyer sur des indicateurs microbiens. Cette démarche a été retenue dans l'étude commandée par le GERNA (Groupe d'étude et de recherche en nutrition animale) en 2008. Cette étude confiée à l'Afssa de Ploufragan en collaboration avec TECALIMAN constituait un test préliminaire pour déterminer les paramètres à optimiser pour l'incorporation d'acides organiques à des fins de maîtrise du risque *Salmonella* dans l'alimentation des volailles. Le protocole considérait (originalité de l'étude) un temps de stockage de l'aliment jusqu'à 72h après traitement sans réfrigération. Différentes formes d'acide (sel ou liquide), différentes natures pour les acides poudres (acide formique ou propionique, tamponnée ou non) ont été incorporées à une concentration de plus de 2% à une forme d'aliment farine et granulée. L'incorporation d'acide était volontairement importante, l'idée n'étant pas de montrer l'efficacité du traitement, mais d'observer si des paramètres influent sur cette efficacité.

Cette étude montre, 24h après application du traitement, une diminution significative de la concentration en entérobactéries dans l'aliment. Cependant, dans les conditions du test, seules les formes liquides atteignent les valeurs définies comme critères d'efficacité du traitement (pour le formiate). Les formes poudre présentent à 24h une efficacité partielle, mais surtout transitoire, puisque les dénombrements d'entérobactéries reviennent au niveau de ceux des contrôles (voire plus haut) 48 et 72h après le traitement. Lorsqu'une forme (ici poudre) présente une efficacité partielle à 24h, un suivi au-delà de cette date est particulièrement important dans la mesure où un retour à des dénombrements a pu être mesuré sans recontamination. Cette étude ne teste pas l'effet additif voire synergique que pourrait générer la combinaison de traitement : par exemple l'effet mécanique et thermique de la granulation, complété par une action chimique présentant un bénéfice partiel (l'addition d'acide sous forme de poudre par exemple). Cette synergie a été suggérée récemment (Xu *et al.*, 2008 ; Amado *et al.*, 2013,) et déjà démontrée sur d'autres supports que l'aliment (Milillo et Ricke, 2010). L'efficacité de traitements acides 24h et 7 jours après addition a été testée pour 11 formulations commerciales aux concentrations recommandées par les fournisseurs. Des diminutions faibles (maximum 1 Log de réduction) dans 7 cas sur 11 à 24h et 7 jours sont observées. Mais le phénomène de récupération n'est pas retrouvé dans cette étude qui met en œuvre des inoculations artificielles de souches en phases stationnaires, ce qui peut être limitant dans ce contexte.

La durée entre la fabrication et l'utilisation effective de l'aliment par l'animal doit être prise en compte. Dans les conditions de l'expérience GERNA, l'aliment peut être considéré comme stable microbiologiquement (conditions témoins) pour la concentration en entérobactéries à partir de 48 h après fabrication. La stabilité apparaît plus rapidement pour un aliment granulé (dès 24h). Le délai entre le traitement et la mesure de l'efficacité apparaît également dans l'étude précédemment citée (Wales *et al.*, 2013) : dans 3 cas sur 11, une faible réduction en entérobactéries (1 Log) n'apparaît que 7 jours après le traitement.

Ces études confirment l'intérêt de considérer l'utilisation d'acides pour la maîtrise du risque *Salmonella* dans l'alimentation des animaux de rente. L'évaluation des paramètres optimaux pour leur incorporation devrait prendre en compte :

- la concentration de l'acide (Wales *et al.*, (2013) notent une différence parfois importante entre les concentrations recommandées par le fabricant et celles nécessaires et suffisantes pour obtenir un effet, même partiel) ;
- la forme de l'acide lors de l'incorporation à l'aliment (principalement liquide ou solide) ;
- La température de stockage (Koyuncu *et al.*, 2013) et la durée de vie commerciale de l'aliment (temps de stockage) (GERNA, Wales *et al.*, 2013) ;
- La nature des matières premières utilisées est aussi un facteur de variation de l'efficacité du traitement observé (Koyuncu *et al.*, 2013 ; Wales *et al.*, 2013).

#### b. Concernant les huiles essentielles

##### i. Efficacité

La question de l'utilisation des huiles essentielles (HE) comme agents naturels de conservation a été essentiellement abordée pour les produits alimentaires destinés à la consommation humaine. Certaines études ont démontré avec succès les applications potentielles des HE afin de réduire ou de contrôler la présence d'agents pathogènes dans les produits alimentaires, tels que le lait (Karatzas *et al.*, 2001), le poisson (Mejlholm et Dalgaard 2002), les fruits (Roller et Seedhar 2002), la viande (Ciani *et al.*, 2000; Tsigarida *et al.*, 2000) et les œufs (Djenane *et al.*, 2011). C'est dans ce contexte qu'ont été testés de nombreux extraits d'HE en raison de leurs propriétés antibactériennes démontrées contre de nombreuses bactéries pathogènes, notamment contre *Salmonella*. Toutes les études recensées portent sur des tests *in vitro*, dans lesquels l'activité antimicrobienne de diverses HE ou de certains de leurs composés aromatiques vis-à-vis de cultures de différentes souches de Salmonelles (Typhi D1 et G7, Typhimurium, Paratyphimurium, Enteritidis, Indiana, Cholerasuis) a été évaluée qualitativement (test de diffusion sur gélose) et/ou quantitativement (détermination des CMI).

Parmi le très large panel d'HE testé, il semblerait que celles composées majoritairement de composés phénoliques présentent une plus grande activité contre *Salmonella* : HE de thym, d'origan, de sarriette, de clous de girofle, de feuilles de cannelle (Dipasqua *et al.* 2005; Oussalah *et al.*, 2007; Sokovie *et al.*, 2007; Moussaoui *et al.*, 2009; Roldan *et al.*, 2010; Dobre and Niculita 2012; Ekren *et al.*, 2013; Miladi *et al.*, 2013). Cependant, cette activité antimicrobienne est difficile à attribuer à un composé majoritaire particulièrement en raison de la complexité chimique et de la composition variable des HE. Ainsi dans l'essai de Cosentino *et al.* (1999), si les HE extraites de quatre espèces de thym riches en phénols, notamment en thymol, présentent une activité antisalmonelle, celle-ci est deux fois moins importante pour l'HE contenant 46% de thymol et 3% de carvacrol que pour celle renfermant 47% de thymol et 21% de carvacrol. De même, dans l'essai de Djenane *et al.*, (2011), l'activité antisalmonelle de l'HE extraite de l'Eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) composée majoritairement (82%) de 1-8 cinéole est 8 fois moins importante que celle de la lavande (*Lavandula angustifolia*) ne contenant pourtant que 38% de 1-8 cinéole. D'autres études confirment ces observations (Cimanga *et al.*, 2002; Bozin *et al.*, 2006; Longaray-Delamare *et al.*, 2007). Des études qui se sont intéressées à l'effet antisalmonelle de composés aromatiques purs, il ressort que les composés phénoliques sont les plus actifs. Parmi eux, le carvacrol et le thymol sont les plus efficaces, suivis par l' $\alpha$ -terpinéol et le linalool (Kim *et al.*, 1995; Cosentino *et al.*, 1999; Sokovie *et al.*, 2007; Al Marini *et al.*, 2013).

##### ii. Mode d'action

L'hydrophobicité des HE et de leurs molécules aromatiques constitutives est une caractéristique importante qui leur permet de s'infiltrer dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire bactérienne, rendant la structure plus perméable (Knobloch *et al.*, 1986; Sikkema *et al.*, 1994). Parce que les HE sont composées de plusieurs molécules aromatiques de structures chimiques différentes, il est probable que leur activité antibactérienne résulte d'une combinaison de

plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires. Les sites et modes d'action des HE au niveau de la bactérie sont divers : dégradation de la paroi cellulaire (Thoroski *et al.*, 1989; Helander *et al.*, 1998), endommagement de la membrane cytoplasmique (Knobloch *et al.*, 1989; Sikkema *et al.*, 1994; Oosterhaven *et al.*, 1995; Ultee *et al.*, 2000; Ultee *et al.*, 2002), endommagement des protéines membranaires (Juven *et al.*, 1994; Ultee *et al.*, 1999), relargage de contenu cellulaire (Oosterhaven *et al.*, 1995; Gustafson *et al.*, 1998; Helander *et al.*, 1998; Cox *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2001; Skandamis *et al.*, 2001; Carson *et al.*, 2002; Ultee *et al.*, 2002), agrégation du cytoplasme (Gustafson *et al.*, 1998) et épuisement de la force proton motrice (Ultee *et al.*, 1999; Ultee and Smid 2001), conduisant à la mort de la cellule bactérienne (Denyer and Hugo 1991a).

Généralement, les HE présentant l'activité antibactérienne la plus intense contiennent un pourcentage élevé de composés phénoliques tels le carvacrol, l'eugénol (2-methoxy-4-(2-propenyl) phénol) et le thymol (Farag *et al.*, 1989; Thoroski *et al.*, 1989; Cosentino *et al.*, 1999; Dorman et Deans 2000; Juliano *et al.*, 2000). Il est donc logique de penser que leur mécanisme d'action serait identique à celui de ces composés phénoliques : endommagement de la membrane cytoplasmique, perturbant la force proton motrice, le flux d'électrons, le transport actif et la coagulation du contenu cellulaire (Denyer et Hugo 1991b; Sikkema *et al.*, 1995; Davidson 1997).

### **Carvacrol et thymol**

Le mode d'action du carvacrol, un des composants majeurs des HE d'origan et de thym, semble avoir reçu prioritairement l'attention des chercheurs. Le carvacrol et le thymol ont des structures très semblables, différant seulement par la position du groupement hydroxyle sur le noyau phénolique. Les deux substances semblent rendre la membrane cellulaire extérieure des bactéries Gram<sup>-</sup> perméable (Lambert *et al.*, 2001). L'altération de sa structure physique causerait l'expansion et la déstabilisation de la membrane, accroissant la fluidité membranaire qui, en retour, augmenterait la perméabilité passive (Ultee *et al.*, 2001), notamment à l'ATP. Cette désagrégation de la membrane peut s'expliquer par la chélation de cations dans la membrane extérieure puisqu'en présence de chlorure de magnésium cette désagrégation n'a pas lieu (Helander *et al.*, 1998). Juven *et al.* (1994) en examinant l'effet du thymol sur *Salmonella* Typhimurium ont émis l'hypothèse que le thymol se lierait aux protéines membranaires par des liaisons hydrogène, modifiant ainsi la perméabilité membranaire ; le thymol se révélant plus actif à pH 5,5 que 6,5 car la non dissociation de la molécule à bas pH, permettrait une meilleure liaison aux parties hydrophobes des protéines et une meilleure dissolution dans la phase lipidique.

### **Carvone, cinnamaldéhyde et $\gamma$ -terpinène**

Contrairement à ce qui a été montré pour *E. coli*, *Streptococcus thermophilus* et *L. lactis*, le carvone serait inefficace sur la membrane extérieure de *Salmonella* Typhimurium, n'ayant pas affecté le pool intracellulaire d'ATP (Helander *et al.*, 1998). Bien que le cinnamaldehyde (3-phenyl-2-propenal) inhibe la croissance de *Salmonella* Typhimurium à des concentrations identiques à celles du carvacrol et du thymol, aucune désagrégation de la membrane extérieure ou épuisement du pool intracellulaire d'ATP n'ont été notés (Helander *et al.*, 1998). Enfin, le  $\gamma$ -terpinène ne perturbe pas la croissance de *Salmonella* Typhimurium (Juven *et al.*, 1994).

Les molécules aromatiques constitutives des HE semblent aussi interagir avec les protéines de la membrane cytoplasmique (Knobloch *et al.*, 1989). On sait que des enzymes comme les ATPases sont localisées dans la membrane plasmique. En raison de l'accumulation des HE dans la bicouche lipidique, deux mécanismes possibles ont été envisagés : perturbation des interactions protéines/lipides membranaires et/ou interaction directe avec la partie hydrophobe des protéines (Juven *et al.*, 1994; Sikkema *et al.*, 1995; Wendakoon and Sakaguchi 1995; Pol *et al.*, 2001).

iii. Paramètres pertinents pour mesurer leur efficacité

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est utilisée dans la plupart des études comme un indicateur de l'activité antibactérienne des HE, bien que sa définition diffère d'une publication à l'autre, ce qui rend difficile la comparaison des résultats entre études. Certaines études font aussi état de concentration minimale bactéricide (CMB) ou de concentration bactériostatique ou encore de concentration létale minimale.

La mesure du pouvoir antibactérien des HE est souvent réalisée par la méthode de diffusion de disque (test de diffusion sur gélose), dans laquelle un disque de papier imbibé d'HE est placé sur une boîte de Pétri contenant un milieu gélosé (agar-agar) inoculé. L'activité antibactérienne est appréciée par la mesure du diamètre (mm) de la zone claire qui se forme autour du disque, appelée encore halo d'inhibition. Cette méthode est généralement utilisée comme un outil de screening et est en général un préalable à la méthode de microdilution permettant d'apprécier la force de l'activité antibactérienne. Celle-ci peut être déterminée par dilution de l'HE dans de l'agar-agar ou un milieu de culture sans gélose. Dans ce dernier cas, la détermination de la concentration bactérienne se fait par densité optique ou par dénombrement d'unités formant la colonie. Certains indicateurs colorés peuvent être ajoutés comme la résazurine (Burt et Reinders 2003; Mann and Markham 1998; Salvat *et al.*, 2001) ou le chlorure de triphényl-tétrazolium (Carson *et al.*, 1995; Elgayyar *et al.*, 2001; Mourey et Canillac 2002), mais les résultats obtenus avec ces indicateurs ne sont pas parfaitement corrélés avec les valeurs de concentration exprimées en CMI.

La rapidité d'obtention de l'effet bactéricide ou la durée de l'effet bactériostatique peut être déterminée en établissant une "courbe de survie" permettant de suivre en fonction du temps le nombre de cellules vivantes restant dans le bouillon après addition de l'HE.

Enfin, la désagrégation de la paroi cellulaire bactérienne et la perte de contenu cellulaire peuvent être approchées par microscopie électronique à transmission (Burt and Reinders 2003; Lambert *et al.*, 2001; Skandamis *et al.*, 2001); cette méthode permettant seulement d'avoir une approche qualitative.

c. Concernant le formaldéhyde

i. Efficacité

Le formaldéhyde ou aldéhyde formique en tant que biocide est largement utilisé pour la désinfection et la prévention de la (re) contamination des locaux d'élevage (Piérré, 2013) ou dans les locaux de santé pour la désinfection de matériels chirurgicaux vis-à-vis de différents pathogènes (Rutala *et al.*, 2008).

L'efficacité du formaldéhyde en tant qu'agent de décontamination vis-à-vis de *Salmonella* dans l'alimentation animale a été évaluée par le SCAN (2001). Les différentes matières premières testées, naturellement contaminées (orge, blé, tourteau de colza ou de soja, coprah) et traitées par incorporation à la teneur de 660 mg de formaldéhyde/kg présentent toutes des niveaux de contamination en *Salmonella* en dessous de la limite analytique de détection. Des aliments du commerce artificiellement contaminés par *Salmonella* Typhimurium ( $10^4$  cfu/g aliment fini) et traités par incorporation de 600 mg de formaldéhyde/kg d'aliment, ont vu leur contamination réduite de 2 à 2,5 log, sans décontamination totale. Ce rapport ne traitait pas du risque de recontamination éventuelle des matières premières. Le rapport concluait également, qu'en l'absence de données expérimentales sur la réduction de *Salmonella* chez l'animal ou les produits animaux, il n'était pas possible de conclure sur l'efficacité globale du formaldéhyde pour réduire l'infection chez les animaux ou la contamination des denrées.

Dans son avis de 2008, l'EFSA (EFSA Journal (2008) 720, 3-84) concluait que les produits à base de formaldéhyde à la '*concentration appropriée*' pouvaient être efficaces pour réduire la contamination par *Salmonella* (et d'autres microorganismes). Ce traitement pouvait également

permettre de prévenir la recontamination ultérieure des aliments (en dépit de sa volatilité) et contribuer à la désinfection des équipements industriels utilisés lors de la fabrication des aliments. L'avis recommandait néanmoins 'de mener davantage de recherches sur l'efficacité relative des décontaminants chimiques des aliments pour animaux et sur leur effet sur le statut sanitaire subséquent au regard de *Salmonella* des animaux nourris avec des rations d'aliments traités'.

Des essais réalisés en conditions de terrain aux USA (Wiernusz, 2013) concernant des aliments pour volaille contaminés artificiellement avec *Salmonella* Tennessee ou *Salmonella* Senftenberg (1.2 à  $6 \times 10^7$  cfu/g d'aliment fini) et traités par le formaldéhyde (100 à 300 mg/kg d'aliment) ont montré une réduction (non quantifiée cependant) de la contamination en *Salmonella* pendant 21 jours après la fabrication de l'aliment. Il est à noter que 90% des échantillons d'aliment prélevés en sortie de mélangeuse restaient positifs à *Salmonella* durant cette période, probablement du fait du niveau élevé de contamination initiale.

Des évaluations de l'efficacité du formaldéhyde comme agent de préservation envers différents microorganismes ont été récemment réalisées (EFSA 2014a, b).

Dans un premier avis (EFSA 2014a) concernant un produit contenant 35% de formaldéhyde et 14% de méthanol et une concentration maximale d'acide formique de 0,05%, un aliment commercial pour poulet, préalablement contaminé artificiellement avec différentes souches de *Salmonella* (Enteritidis, Typhimurium, Senftenberg, et Montevideo) à des concentrations de  $2,3 \times 10^6$  à  $1 \times 10^9$  ufc/g d'aliment fini a été traité, avec des concentrations croissantes de formaldéhyde (0, 222, 336, 504, 759, 1140 et 1713 mg de formaldéhyde/kg d'aliment). L'analyse des aliments montre l'absence de *Salmonella* dès 1h après l'application de formaldéhyde et ce, jusqu'à 48h après le début de l'application quand les concentrations appliquées sont supérieures à 759 mg/kg. Cette valeur est supérieure à celle pouvant engendrer des effets négatifs chez la volaille ou le porc (cf. ci-dessus et l'avis de l'EFSA (2014a). Les concentrations inférieures à 759 mg/kg contribuent néanmoins à la réduction de *Salmonella*, mais l'avis ne précise pas jusqu'à quelles valeurs. Dans ce même avis, un aliment commercial pour poulet, préalablement contaminé artificiellement avec  $10^3$  ufc/g de *Salmonella* Typhimurium a été traité par une concentration unique (1 g/kg aliment) d'une solution de formaldéhyde (32%). L'analyse des aliments montre une réduction de *Salmonella* dès la première heure et pendant 48h après l'initiation du traitement. L'ampleur de la réduction n'est pas indiquée. L'EFSA conclut qu'entre 200 et 1000 mg/kg, le formaldéhyde peut être considéré comme un agent de préservation

Dans un second avis (EFSA 2014b) concernant un produit contenant 37% de formaldéhyde et 14% de méthanol et une concentration maximale d'acide formique de 0,03%, un aliment commercial pour poulet et du tourteau de soja, préalablement contaminé artificiellement avec  $1 \times 10^5$  ufc de *Salmonella* Typhimurium (associé à *Escherichia coli* et *Enterobacter cloacae*), a été traité par des concentrations croissantes (0, 68, 340, 510 and 680 mg formaldéhyde/kg aliment). L'analyse des aliments effectuée avant traitement, puis à 1j, 7j, 30j, 60j et 90j après l'initiation du traitement ne permet pas de montrer une réduction systématique et durable de *Salmonella* pour les doses testées. Dans ce second avis, un aliment complémentaire pour ruminant, préalablement contaminé artificiellement avec  $1 \times 10^4$  ufc /g de *Salmonella* Typhimurium,  $1,0 \times 10^4$  ufc/g *Salmonella* Enteritidis (associé à  $1,0 \times 10^6$  ufc /g *Campylobacter jejuni* et  $1 \times 10^6$  ufc /g *Escherichia coli*), a été traité par des concentrations croissantes (0, 68, 340 and 680 mg formaldéhyde/kg aliment). L'analyse des aliments effectuée avant traitement, puis 1j, 7j, 30j, 60j et 90j après l'initiation du traitement ne permet pas de montrer une réduction systématique et durable de *Salm* Typhimurium pour les doses testées. Aucune information concernant *Salmonella* Enteritidis n'est présentée. L'EFSA conclut que l'efficacité du formaldéhyde aux doses testées n'est pas démontrée pour la préservation des aliments vis-à-vis de *Salmonella* (ou des autres microorganismes testés, à l'exception d'*E coli* pour lequel les doses les plus élevées sont efficaces).

ii. Mode d'action

Le formaldéhyde (CH<sub>2</sub>O) est un composé métaboliquement très actif dans les réactions transférant un groupe méthyle (CH<sub>3</sub>) d'une molécule à une autre. Ces réactions d'alkylation s'effectuent essentiellement sur les groupes carboxyle, sulfhydryle et hydroxyle des protéines et des groupements azotés des bases puriques des acides nucléiques. En conséquence, il induit l'inhibition du métabolisme, de la synthèse d'ADN et de la réplication des microorganismes sensibles. Il peut aussi s'associer aux glycopeptides des parois cellulaires.

iii. Paramètres pertinents pour mesurer leur efficacité

L'évaluation de l'efficacité d'un traitement anti-salmonelles consiste à caractériser à un instant donné la diminution de la contamination de *Salmonella*, exprimée par la réduction du logarithme de la concentration en salmonelles dans l'aliment par rapport à une situation témoin. Il est usuel de considérer qu'une réduction de 3 unités log de cette concentration reflète un traitement efficace.

### 3- Identification des risques potentiels de ces produits pour la sécurité des animaux ciblés, des consommateurs, des utilisateurs, de leur environnement

a. Concernant les acides organiques

Les acides organiques concentrés présentent un danger chimique pour les manipulateurs et la gestion de ce risque relève de dispositions de sécurité au travail qui ne sont pas évoquées ici. Au-delà, concernant l'animal cible, l'aliment fini ne présente pas de risque particulier. Pour mettre en perspective cette affirmation, il faut se souvenir que les concentrations intestinales physiologiques en acides gras volatils dans le colon des porcs sont de l'ordre de 2 g/L (Fravalo, communication personnelle). Une synthèse des études pour le propionate a été produite par l'EFSA en 2011 (EFSA, 2011). Des diminutions de performance zootechnique n'apparaissent que pour des doses supérieures (souvent largement) à 1%. Cette synthèse permet de noter que les volailles semblent sensibles à l'incorporation d'acide au-delà de 10 g/kg d'aliment. Pour le porc et les ruminants, des dosages jusqu'à 3% ne semblent pas affecter la croissance des animaux.

Les acides organiques sont couramment retrouvés dans l'alimentation humaine (EFSA, 2011). Le problème de la toxicité pour le consommateur peut être écarté puisque ce sont des composés que l'on retrouve en grande quantité dans l'intestin et pour l'environnement, du fait des fermentations intestinales. L'évaluation du risque pour le consommateur a été réalisée par l'EFSA (EFSA, 2011) et ses conclusions sur ce point sont une absence de préoccupation, tant pour le consommateur que pour l'environnement, du moins pour l'usage de l'acide propionique. La question d'actualité est l'influence de l'introduction d'un additif alimentaire à l'aliment dans le but d'en modifier la flore. Les impacts, quand ils sont rapportés, sont aujourd'hui majoritairement favorables, mais une évaluation particulière des effets induits au niveau de l'écologie microbienne digestive de l'animal lui-même pourra être envisagée quand les techniques *ad hoc* seront disponibles, tant le rôle central de la flore intestinale sur la santé du mammifère émerge dans la littérature scientifique (Berer et Krishnamoorthy, 2012; Goel *et al.*, 2014).

b. Concernant les huiles essentielles

En règle générale, les HE communes ont une toxicité par voie orale faible ou très faible avec des DL50 supérieures à 5 g/kg. En ce qui concerne les extraits de Sarriette et d'Origan, la toxicité est un plus élevée autour des 1,4 g/kg (données observées chez l'animal) (Bruneton, 1999). Chez le rat, la DL50 par voie orale du D-limonène est de 5g/kg (Hooser, 1990), celle du thymol de 0,98 g/kg (Budavari *et al.*, 1996) et celle du menthol de 3,18 g/kg (Budavari *et al.*, 1996). La DL 50 par administration cutanée chez le lapin ou orale chez le rat est comprise pour l'HE de Melaleuca entre 2 et 5 g/kg (Knight *et al.*, 1994). Quelques exemples montrent que des solutions concentrées d'HE peuvent être responsables de toxicité. Ainsi, une utilisation prolongée des HE à thuyones (Thuya, Absinthe, Sauge officinale) est neurotoxique. Chez la souris, la DL50 de l' $\alpha$ -thuyone après administration intrapéritonéale est estimée à 45 mg/kg et par voie orale à 134 mg/kg (Höld *et al.*, 2000). L'anéthole peut induire des tremblements de la face et des membres, une excitation psychique et des lésions hépatiques (Wichtl et Anton 1999). L'HE extrait du romarin est convulsivante et celle de menthol peut inhiber les réflexes et même induire une paralysie bulbaire (Wichtl et Anton 1999). Quelques données montrent que l'eugénol, le menthol et le thymol peuvent causer des irritations de la sphère buccale. Certaines HE et/ou leurs composants sont connus aussi pour provoquer, par contact, des dermatites allergiques.

Des composés phénoliques peuvent se retrouver dans le lait de vache, de brebis et de chèvre, dont les phénols simples des HE (Lopez et Lindsay, 1993). Ces composés sont des dérivés sulfate-, phosphate- ou glucuro-conjugués. Ils proviennent de la métabolisation des composés aromatiques présents dans l'alimentation. Takada *et al.* (1979) avaient montré que l'organisme humain était capable de détoxifier le thymol (ingéré à la dose de 0,6 g par kg de poids vif) puisque celui-ci est excrété dans les urines sous forme de thymol glucuronide, thymol sulfate et thymolhydroquinone sulfate (en petite quantité par rapport aux deux autres). Sur la base des éléments présentés dans le rapport d'enregistrement du thymol en tant que biopesticide, l'Agence américaine de Protection Environnementale a conclu à une absence de risque de ce composé aromatique pour la santé humaine. Une absence de risque a aussi été enregistrée pour l'HE d'arbre à thé (contenant 45 à 50 % de monoterpénols dont 39 à 41% de terpinène-4-ol et 6 à 8% d' $\alpha$ -terpinéol) par l'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire (ARLA, 2014).

Des composés phénoliques peuvent se retrouver dans le lait, dont les phénols simples des HE (Lopez et Lindsay, 1993 ; tableau 1). Ces composés sont des dérivés sulfate-, phosphate- ou glucuro-conjugués. Ils proviennent de la métabolisation des composés aromatiques présents dans l'alimentation.

Tableau 1 : Concentration (ppb) des phénols volatiles dans les isolats de lait écrémé de vache, brebis et chèvre (d'après Lopez and Lindsay, 1993).

	<b>Vache</b>	<b>Brebis</b>	<b>Chèvre</b>
<b>m-crésol</b>	70	50	60
<b>o-crésol</b>	310	6150	2140
<b>p-crésol</b>	70	3610	610
<b>thymol</b>	4	10	20
<b>carvacrol</b>	14	80	220

Le carvacrol est excrété dans les urines du rat et du lapin ; un tiers du thymol ingéré est excrété inchangé dans les urines du chien, et on n'en détecte pas dans les fèces (Scroder et Vollner., 1932 ; Robbins, 1934 ; cités par Austgulen *et al.*, 1987). Le thymol est retrouvé dans les urines du lapin, du chien et de l'homme sous forme de glucuronides et de sulfates avec quelques oxydations sur la partie cyclique (Williams, 1959, cité par Austgulen *et al.*, 1987). Takada *et al.*

(1979) confirment l'excrétion du thymol dans les urines du lapin et de l'homme sous les formes suivantes :

- thymol intact chez le lapin recevant ce composé aromatique à la dose de 0,5 g par kg de poids vif,
- thymol glucuronide, thymol sulfate et thymolhydroquinone sulfate (en petite quantité par rapport aux deux autres) chez l'homme ayant absorbé du thymol à la dose de 0,6 g par kg de poids vif.

Austgulen *et al.* (1987) ont montré que le thymol et le carvacrol sont rejetés dans les urines du rat sous forme conjuguée avec une oxydation sur la chaîne aliphatique, 24 heures après administration par tube intra gastrique. Certains phénols, infusés dans le rumen de mouton, ne sont pratiquement pas dégradés : le phénol et l'orcinol se retrouvent intacts dans les urines à 94 et 99% respectivement. D'autres se retrouvent à des taux moins élevés : 55% pour le catéchol, 77% pour le quinol (Martin *et al.*, 1983). En ce qui concerne les monoterpènes oxygénés, Cluff *et al.* (1982) avaient émis l'hypothèse selon laquelle une grande partie de ces composés ingérés *via* la consommation du végétal *Artemisia tridentata* par le cerf passerait la barrière ruminale pour gagner la circulation générale puisque seulement 18% de ces molécules aromatiques consommées sont retrouvés dans le jus de rumen.

Ainsi, la toxicité des HE est variable en fonction de leur composition, de la voie d'administration et de l'espèce animale.

Concernant la sécurité pour l'environnement, le rapport de l'ARLA (2014) mentionne que les nombreux composés aromatiques qui composent une HE sont tous considérés comme très volatiles et ayant une faible solubilité dans l'eau (Budaviri *et al.*, 1996).

c. Concernant le formaldéhyde

✓ **Contexte**

Dans l'Union européenne (UE), le formaldéhyde est autorisé comme additif technologique en alimentation animale. Il appartient au groupe fonctionnel des agents de conservation, *preservative* en anglais. Il est utilisé comme additif dans les ensilages ou comme agent de conservation (antimicrobien) dans le lait écrémé destiné à l'alimentation des porcs âgés de moins de 6 mois. La teneur en formaldéhyde autorisée est inférieure à 600 mg/kg d'aliment à 12% d'humidité (< 0,06 %). La réévaluation récente par le comité FEEDAP de l'EFSA du profil toxicologique de cet additif a fait l'objet de plusieurs avis publiés dans le journal de l'EFSA (EFSA Journal 2014; 12(2):3561, EFSA Journal 2014; 12(2):3562, EFSA Journal 2014; 12(2):3550) qui font suite à un avis plus ancien (EFSA Journal 2006; 415:1-10) et un rapport de l'Afssa publié en 2004. Deux de ces avis ont été rédigés à partir d'éléments fournis par deux pétitionnaires différents complétés par des données issues de la bibliographie. Leurs principales conclusions sont reprises dans les parties présentées ci-après.

✓ **Genèse, dégradation et réactivité du formaldéhyde**

Le formaldéhyde est aussi un produit issu du métabolisme général (Dhareshwar et Stella, 2008). Il provient du métabolisme du méthanol, d'acides organiques à très courte chaîne, de certains acides aminés (sérine, glycine ou méthionine) ou de la choline, ou de la déméthylation de certains substrats pris en charge par des monooxygénases à cytochrome P-450. Il peut aussi résulter de la progression de la peroxydation des lipides.

Le métabolisme du formaldéhyde est rapide ; il est catalysé par une alcool déshydrogénase (ADH5) qui transforme le formaldéhyde en acide formique. L'acide formique peut être repris comme précurseur dans la méthylation des nucléotides ou des protéines, ou être excrété dans l'urine ou, enfin, oxydé en CO<sub>2</sub> ensuite exhalé.

En tant que composé réactif présentant des propriétés électrophiles, le formaldéhyde peut réagir avec des molécules organiques sur des sites nucléophiles, le plus souvent des amines primaires ou secondaires ou thiols, et ainsi modifier de façon plus ou moins réversible des

protéines ou des acides nucléiques. Une progression intramoléculaire de l'alkylation modifie de façon irréversible les macromolécules.

Les teneurs circulantes en formaldéhyde produit de façon endogène varient peu entre espèces : 2,2, 2,4, 2,6 mg/L chez le rat, le singe ou l'homme (Heck *et al.*, 1982; 1985; Casanova *et al.*, 1988) et sont plus faibles chez les bovins, de l'ordre de 0,5 mg/L (Buckley *et al.*, 1988). La demi-vie du formaldéhyde est estimée à 1,5 min. Ces deux paramètres, concentrations circulantes et demi-vie, et la nature fortement hydrosoluble du formaldéhyde permettent d'estimer l'ordre de grandeur des quantités de formaldéhyde éliminées, prioritairement sous forme de CO<sub>2</sub>, par un individu de 60 kg : 50 g par jour (EFSA Journal 2014; 12(2):3550).

#### ✓ **Sécurité pour l'animal**

Les capacités de prise en charge métabolique du formaldéhyde par l'organisme sont élevées et sont en lien avec une production endogène significative. Néanmoins, un apport par voie alimentaire de formaldéhyde ne peut dépasser certaines limites (600 mg de formaldéhyde/kg d'aliment pour porcelet avec une marge de sécurité de 2,5 et 600 mg/kg pour volaille et caille). Pour ces deux dernières catégories, aucune teneur sans effet ne peut être avancée si l'on tient compte d'effets négatifs sur les organes de reproduction, même si ce type de critères n'est pas pris en compte dans les études de tolérance.

Chez le veau, aucune étude de tolérance n'a été produite. Une étude ancienne pointe l'existence de lésions du tractus digestif en lien avec des symptômes cliniques chez des animaux nourris avec du lait écrémé contenant du formaldéhyde (Preston *et al.*, 1960).

#### ✓ **Sécurité pour les personnels exposés**

Du fait de sa réactivité chimique forte, le formaldéhyde est une substance fortement toxique pour la peau, les yeux, le système respiratoire. Outre les propriétés d'irritation de la peau et de sensibilisation respiratoire, le formaldéhyde est cancérigène chez l'homme par voie respiratoire. Les mesures de protection des personnes exposées professionnellement au formaldéhyde par voie respiratoire ou cutanée s'imposent. L'évolution de la classification de ce produit pourraient engendrer des restrictions d'utilisation.

#### ✓ **Sécurité pour le consommateur**

Les valeurs de résidus en formaldéhyde mesurées dans les produits animaux après administration orale de formaldéhyde aux espèces cibles sont faiblement augmentées. Les valeurs absolues en formaldéhyde sont peu élevées dans les tissus ou le lait et ne dépassent pas 0,3 mg/kg. Une estimation haute de la consommation de formaldéhyde avoisine les 4 mg/jour/personne. Cette valeur ne représente que 0,008% de la quantité éliminée quotidiennement pour un individu de 60 kg. Aucun risque supplémentaire pour le consommateur ne peut être étayé.

#### ✓ **Sécurité environnementale**

Compte tenu de la stabilité chimique faible du formaldéhyde, et de sa prise en charge métabolique importante, de l'absence d'accumulation dans les organismes, le formaldéhyde utilisé comme additif dans les aliments ne pose pas de problème particulier pour l'environnement. L'air est le compartiment dans l'environnement dont les teneurs en formaldéhyde sont détectables et sont prioritairement d'origine industrielle.

#### 4- Conséquences de l'utilisation des produits en termes de développement de résistance chez *Salmonella*

##### a. Concernant les acides organiques

Les bactéries sont capables de s'adapter à un stress acide, qui peut favoriser leur colonisation chez les animaux. Cependant, cette adaptation au stress est finement régulée (Zgurskaya *et al.*, 2011) et réversible (Deiningner *et al.*, 2011). Il n'existe donc pas de phénomène de résistance aux acides qui soit acquise et transmissible pour les entérobactéries.

##### b. Concernant les huiles essentielles

La complexité et le nombre de molécules aromatiques composant une HE semblent pouvoir limiter les résistances bactériennes, mais aucune donnée ne permet de l'affirmer.

##### c. Concernant le formaldéhyde

La résistance aux biocides et l'induction de résistance aux antibiotiques par les biocides ont fait l'objet de nombreuses revues (DG Sanco 2009 ; DG Sanco 2010). La résistance aux aldéhydes de façon générale et au formaldéhyde en particulier, a été montrée chez *E.coli* (Kummerle *et al.*, 1996), chez *Enterobacter gergoviae* (Davin-Regli *et al.*, 2006) et *Pseudomonas aeruginosa* (Sondossi *et al.*, 1985 ; Ferrarese *et al.*, 2003).

Aux USA, une étude effectuée sur des élevages de poules (Davison *et al.*, 2003) pour lesquels était observée une récurrence des problèmes liés à *Salmonella* Enteritidis, a montré qu'il n'existait pas de différence de sensibilité, ou de différence de résistance à divers désinfectants communément utilisés (dont le formaldéhyde) chez les souches de *Salmonella* Enteritidis de ces élevages en comparaison d'élevages qui avaient réussi à éliminer cette bactérie.

Au Danemark, des études effectuées sur 286 élevages de poules (Gradel *et al.*, 2005) concernant 286 isolats issus de 7 souches de *Salmonella* ont montré une variabilité intersouches importante concernant les CMI au formaldéhyde (et à 4 autres désinfectants). Ces études ont montré par ailleurs qu'il n'existait pas de relation entre les variations des CMI du formaldéhyde et la persistance de *Salmonella* dans ces élevages, ou la fréquence d'utilisation de ces désinfectants. Par ailleurs, l'adaptation ou la désadaptation de ces souches au formaldéhyde n'affecte pas les CMI.

Cet ensemble de données suggère qu'il existe peu de résistance au formaldéhyde.

#### 5- Identification des problèmes relatifs à la méthodologie de détection

Le premier obstacle à la capacité de mettre en évidence une action bactéricide spécifique à *Salmonella* dans un aliment pour animaux est la difficulté de détecter la bactérie dans cette matrice. D'une part, cette réalité est due à la faible prévalence, même si cette faible prévalence (éventuellement quelques cellules dans un silo), représente une réalité tangible en termes de risque de contamination des animaux de l'élevage, puis de contamination de la chaîne alimentaire. D'autre part, la distribution des *Salmonella* dans ce support est imaginée non homogène avec la présence de structure de type microcolonie dans ce silo. En conséquence, l'échantillonnage est forcément composite, et la prise d'essai (100 g en France, 200 g aux USA) est plus importante qu'en hygiène alimentaire.

Dans l'approche la plus souhaitable, un dénombrement de la bactérie cible (*Salmonella*) serait nécessaire pour quantifier la décontamination. Les méthodes normalisées de détection

(ISO6579, annexe D) et de quantification (approches NPP) ne sont pas validées *sensu stricto* pour la matrice aliment pour animaux.

Que ce soit pour quantifier ou détecter une bactérie par une méthode de culture cellulaire, l'étape préalable est une remise en suspension de l'échantillon dans un milieu de culture. A cette occasion, la présence d'acides ou d'aldéhyde dans l'échantillon peut provoquer un effet masquant lors de l'analyse bactériologique (Carrique-Mas *et al.*, 2007), avec le risque d'apparition de faux négatif et d'erreur par excès en statuant sur l'efficacité d'un acide pour lutter contre la bactérie en alimentation animale. Il est important de tenir compte de ce paramètre, très fort pour les acides, et d'appliquer les méthodes de culture les plus conservatrices (dilution importante et rapide dans des volumes importants de milieu de culture adéquatement tamponné, incluant éventuellement des corrections de pH par des agonistes (NaOH selon Carrique Mas *et al.*, 2007). Les bactéries présentes dans l'aliment (faible activité de l'eau, chocs thermique et physique préalables) peuvent être considérées dans un statut physiologique compromis, et des approches culturales en double couche de gélose peuvent alors trouver ici tout leur intérêt (Speck *et al.*, 1975).

Comme l'étude GERNA le propose, l'utilisation d'une matière première naturellement et intensément contaminée permet de constituer un aliment de teneur connue en bactérie cible dans un état physiologique réaliste. C'est une alternative intéressante. L'usage des entérobactéries comme indicateur apparaît judicieux. Il reste qu'il est particulièrement difficile d'évaluer en conditions rigoureuses le bénéfice d'un traitement de l'aliment en cours de fabrication. Alors l'étude de Sauli *et al.*, (2005) est un bon encouragement dans le sens où elle établit, par modélisation, que le bénéfice maximum théorique correspond à une réduction de 4 Log pour la contamination en *Salmonella* dans un lot d'aliment traité (acide plus chaleur). Dans ces conditions, le pourcentage d'échantillons positifs est nul pour un niveau initial de 34%. Les paramètres d'utilisation des additifs dans l'aliment doivent être optimisés pour tendre vers une efficacité optimum du traitement.

## 6- Conclusions de l'expertise collective

La maîtrise de *Salmonella* reste une priorité, à la fois du point de vue de la santé publique et de celui des industriels des filières de productions de denrées d'origine animale, avec des enjeux de conformité aux évolutions réglementaires. Cette nécessité se traduit par la mise en place de programmes de surveillance et de maîtrise intégrés de la ferme à la table, particulièrement organisée et planifiée en Europe depuis 2003. Quelles que soient les améliorations disponibles pour l'abattage et la transformation, la volonté de se rapprocher du risque minimum demande une part importante de la maîtrise dès l'élevage. Les mesures les plus performantes sont liées aux progrès en matière d'application des mesures de biosécurité et d'hygiène. C'est la maîtrise de l'hygiène et de la biosécurité qui constitue le levier le plus puissant pour maîtriser la présence de *Salmonella* chez les animaux en production. Mais, de façon complémentaire, l'aliment, au moins en tant qu'intrant obligatoire dans l'élevage, reste une source de contamination potentielle, particulièrement pour un élevage ayant atteint un haut niveau de pratiques sanitaires et de biosécurité.

### - Concernant les acides organiques

Les acides organiques font partie des additifs alimentaires qui ont un effet bactéricide sur *Salmonella in situ* lors de la production d'aliment du bétail. La démonstration de l'efficacité de la décontamination (et pas d'un effet bactériostatique) peut être envisagée tant sur les matières premières (éventuellement les plus à risque) que sur l'aliment complet. Cette démonstration nécessite de considérer les nombreux paramètres qui influencent l'efficacité des acides. Il faudrait également tenir compte des contraintes liées aux méthodes de laboratoire utilisées, en particulier pour les risques de masquage des salmonelles par ces produits. Pour démontrer l'efficacité d'un traitement par un additif à base d'acides organiques, la procédure devra

particulièrement tenir compte de la durée possible de stockage de l'aliment. Aucune résistance aux acides, acquise et transmissible pour les entérobactéries n'a été mise en évidence à l'heure actuelle.

- Concernant les huiles essentielles

Aucune étude n'a été consacrée à l'effet des huiles essentielles ou de leurs composés aromatiques principaux sur des aliments pour animaux, naturellement ou artificiellement contaminés par *Salmonella*. En l'absence de données, il n'est donc pas possible, pour l'instant, de se prononcer sur le classement des huiles essentielles dans une nouvelle catégorie "décontaminants biologiques". Cependant, au regard de leurs effets sur les aliments destinés à la consommation humaine, elles présentent un intérêt potentiel. Des recherches sont indispensables pour évaluer l'efficacité des huiles essentielles en tant qu'agents de décontamination microbienne des aliments pour animaux.

- Concernant le formaldéhyde

Aux doses comprises entre 200 et 1000 mg/kg, le formaldéhyde associé au méthanol présente une efficacité certaine pour la décontamination des aliments pour animaux vis-à-vis des salmonelles. Néanmoins, certaines études ont montré la possibilité qu'aurait le formaldéhyde de masquer la présence de salmonelles dans l'aliment. Par ailleurs, quand les teneurs en formaldéhyde dépassent 600 mg/kg dans les aliments, les performances zootechniques de certaines espèces sont altérées. Le formaldéhyde ne semble pas induire de résistance chez les salmonelles.

#### **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 du CES « Alimentation animale ».

Conformément à la demande, le traitement de la présente saisine ne porte pas sur l'évaluation de la sécurité d'additifs spécifiques, qui seraient utilisés aux fins de décontaminants des aliments pour animaux. La mise en œuvre de ces substances devra faire l'objet d'une évaluation approfondie, prenant en compte l'ensemble des corpus réglementaires en vigueur. On rappellera en particulier que, conformément au Code du Travail, la mise en œuvre de l'ensemble des substances classées 1A ou 1B, à l'exemple du formaldéhyde, doivent faire l'objet d'une recherche de substitution systématique, afin de prévenir et limiter l'exposition des personnes concernées.

**Marc Mortureux**

#### **MOTS-CLES**

Alimentation animale, additif, salmonelle, acide, formaldéhyde, huiles essentielles, biocide

## BIBLIOGRAPHIE

### Acides organiques

- Amado IR, Vázquez JA, Fuciños P, Méndez J, Pastrana L. Optimization of antimicrobial combined effect of organic acids and temperature on foodborne Salmonella and Escherichia coli in cattle feed by response surface methodology. *Foodborne Pathog Dis.* 2013 Dec;10(12):1030-6.
- Andino A, Pendleton S, Zhang N, Chen W, Critzer F, Hanning I. Survival of Salmonella enterica in poultry feed is strain dependent. *Poult Sci.* 2014 Feb;93(2):441-7.
- Beloil PA, Fravallo P, Fablet C, Jolly JP, Eveno E, Hascoet Y, Chauvin C, Salvat G, Madec F. Risk factors for Salmonella enterica subsp. enterica shedding by market-age pigs in French farrow-to-finish herds. *Prev Vet Med.* 2004 Apr 30;63(1-2):103.
- Berer K, Krishnamoorthy G. Commensal gut flora and brain autoimmunity: a love or hate affair? *Acta Neuropathol.* 2012 May;123(5):639-51.
- Berk PA, Jonge R, Zwietering MH, Abee T, Kieboom J: Acid resistance variability among isolates of Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104. *J Appl Microbiol* 2005, 99(4):859–866.
- Brooks, P. 1991. Meat and bone meal: The underutilized raw material. *Feedstuffs.* July 8, p. 13.
- Calhoun LN, Kwon YM. The effect of long-term propionate adaptation on the stress resistance of Salmonella Enteritidis. *J Appl Microbiol.* 2010 Oct;109(4):1294-300.
- Carrique-Mas JJ, Bedford S, Davies RH. Organic acid and formaldehyde treatment of animal feeds to control Salmonella : efficacy and masking during culture. *J Appl Microbiol.* 2007 Jul;103(1):88-96.
- Cherrington CA, Hinton M, Chopra I. Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in Escherichia coli. *J Appl Bacteriol.* 1990 Jan;68(1):69-74.
- Clark GM, Kaufmann AF, Gangarosa EJ, Thompson MA. Epidemiology of an international outbreak of Salmonella agona. *Lancet* 1973 Sep 1;2(7827):490-3.
- Clark, D.P. & Cronan, J.E. (2005). Two-carbon compounds and fatty acids as carbon sources. In F.C., Neidhardt (Ed.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* Web edn. Available online at: <http://www.ecosal.org/ecosal/index.jsp>. Consulté avril 2014
- Deininger KN1, Horikawa A, Kitko RD, Tatsumi R, Rosner JL, Wachi M, Slonczewski JL. A requirement of TolC and MDR efflux pumps for acid adaptation and GadAB induction in Escherichia coli. *PLoS One.* 2011 Apr 26;6(4):e18960.
- Durant JA, Corrier DE, Ricke SC. Short-chain volatile fatty acids modulate the expression of the hilA and invF genes of Salmonella Typhimurium. *J Food Prot.* 2000 May;63(5):573-8.
- Durant JA, Corrier DE, Byrd JA, Stanker LH, Ricke SC. Feed deprivation affects crop environment and modulates Salmonella enteritidis colonization and invasion of leghorn hens. *Appl Environ Microbiol.* 1999 May;65(5):1919-23.
- DEFRA : [www.defra.gov.uk/vla/reports/docs/rep\\_salm09\\_chp11.pdf](http://www.defra.gov.uk/vla/reports/docs/rep_salm09_chp11.pdf) , consulté avril 2014
- EFSA 2006 Report on the Analysis of the baseline study on the prevalence of Salmonella in holdings of laying hen flocks of Gallus gallus, *The EFSA Journal* (2007) 97.
- EFSA 2007 Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in broiler flocks of Gallus gallus, in the EU, 2005-2006 *The EFSA Journal* (2007) 98, 1-85.
- EFSA 2008. Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animal. *The EFSA Journal* (2008) 720, 1-84.
- EFSA 2010. Scientific Opinion on a Quantitative Microbiological Risk Assessment of Salmonella in slaughter and breeder pigs, *The EFSA Journal* 2010; 8(4):1547.
- EFSA 2011. Scientific Opinion on the safety and efficacy of propionic acid, sodium propionate, calcium propionate and ammonium propionate for all animal species. *Journal* 2011;9(12):2446.
- EFSA2012. *Journal* 2012;10(3):2597
- FDA Salmonella assignment program : <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/Products/AnimalFoodFeeds/Contaminants/ucm277264.htm> consulté avril 2014.
- Flythe MD, Russell JB. Fermentation acids inhibit amino acid deamination by Clostridium sporogenes MD1 via a mechanism involving a decline in intracellular glutamate rather than protonmotive force. *Microbiology.* 2006 Sep;152(Pt 9):2619-24.
- Fratamico PM. Tolerance to stress and ability of acid-adapted and non-acid-adapted Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104 to invade and survive in mammalian cells in vitro. *J Food Prot.* 2003 Jul;66(7):1115-25.
- Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Hautefort I, Thompson A, Hinton JC, Van Immerseel F. Butyrate specifically down-regulates salmonella pathogenicity island 1 gene expression. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Jan;72(1):946-9.
- Goel A, Gupta M, Aggarwal R. Gut microbiota and liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014 Feb 18. . doi: 10.1111/febs.12806.
- Grimont P. A.D., François-Xavier Weill WHO COLLABORATING CENTRE FOR REFERENCE AND RESEARCH ON SALMONELLA - ANTIGENIC FORMULAE OF THE SALMONELLA SEROVARS 9th edition 2007.

- Hoszowski A., Wasyl D.: Typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka isolates. *Vet. Microbiol.*, 2001, 80, 139-148.
- Hung CC, Garner CD, Slauch JM, Dwyer ZW, Lawhon SD, Frye JG, McClelland M, Ahmer BM, Altier C. The intestinal fatty acid propionate inhibits *Salmonella* invasion through the post-translational control of HilD. *Mol Microbiol.* 2013 Mar;87(5):1045-60.
- Hsiao, C. and Siebert, K.J. 1999. Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 47: 189–201.
- Joris A.M. Missotten, Joris Michiels, Anneke Ovyne, Stefaan De Smet & Noël A. Dierick (2010) Fermented liquid feed for pigs, *Archives of Animal Nutrition*, 64:6, 437-466.
- Kashket E. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Reviews* 46 (1987) 233-244.
- Koyuncu S, Andersson MG, Löfström C, Skandamis PN, Gounadaki A, Zentek J, Häggblom P. Organic acids for control of *Salmonella* in different feed materials. *BMC Vet Res.* 2013 Apr 18;9:81.
- Lawhon SD, Maurer R, Suyemoto M, Altier C. Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol Microbiol.* 2002 Dec;46(5):1451-64.
- Lee JA. Recent trends in human salmonellosis in England and Wales: the epidemiology of prevalent serotypes other than *Salmonella typhimurium*. *J Hyg (Lond).* 1974 Apr;72(2):185-95.
- Letellier A., S. Messier, L. Lessard and S. Quessy. Assessment of various treatments to reduce carriage of *Salmonella* in swine, *Can. J. Vet. Res.* 64 (2000), pp. 27–31.
- Li X, Bethune LA, Jia Y, Lovell RA, Proescholdt TA, Benz SA, Schell TC, Kaplan G, Mc Chesney DG. Surveillance of *Salmonella* prevalence in animal feeds and characterization of the *Salmonella* isolates by serotyping and antimicrobial susceptibility. *Foodborne Pathog Dis.* 2012 Aug;9(8):692-8.
- Lianou A, Koutsoumanis KP Strain variability of the behavior of foodborne bacterial pathogens: a review. *Int J Food Microbiol.* 2013 Nov 1;167(3):310-21
- Ménard J., A. Letellier, C. Surprenant, B. Laplante, S. Quessy. Global *Salmonella* control in an integrated swine production system. *Safepork 2009 Quebec* page 30.
- Milillo SR, Ricke SC. Synergistic reduction of *Salmonella* in a model raw chicken media using a combined thermal and acidified organic acid salt intervention treatment. *J Food Sci.* 2010 Mar;75(2):M121-5.
- Papadopoulou C, Carrique-Mas JJ, Davies RH, Sayers AR. Retrospective analysis of *Salmonella* isolates recovered from animal feed in Great Britain. *Vet Rec.* 2009 Dec 5;165(23):681-8.
- Rishi P, Ricke S. HilA gene expression in SCFAs adapted and inorganic acid challenged *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Nepal Med Coll J.* 2007 Sep;9(3):162-5.
- Rose N, Mariani JP, Drouin P, Toux JY, Rose V, Colin P. A decision-support system for *Salmonella* in broiler-chicken flocks. *Prev Vet Med.* 2003 May 30;59(1-2):27-42.
- Sauli I, Danuser J, Geeraerd AH, Van Impe JF, Rüfenacht J, Bissig-Choisat B, Wenk C, Stärk KD. Estimating the probability and level of contamination with *Salmonella* of feed for finishing pigs produced in Switzerland-the impact of the production pathway. *Int J Food Microbiol.* 2005 Apr 15;100(1-3):289-310.
- Shah DH, Casavant C, Hawley Q, Addwebi T, Call DR, Guard J. *Salmonella* Enteritidis strains from poultry exhibit differential responses to acid stress, oxidative stress, and survival in the egg albumen. *Foodborne Pathog Dis.* 2012 Mar;9(3):258-64.
- Smith RP, Clough HE, Cook AJ. Analysis of meat juice ELISA results and questionnaire data to investigate farm-level risk factors for *Salmonella* infection in UK pigs. *Zoonoses Public Health.* 2010 Nov;57 Suppl 1:39-48.
- Speck ML, Ray B, Read RB: Repair and enumeration of injured coliforms by a plating procedure. *Appl Microbiol* 1975, 29(4):549–550.
- Sprong, R.C., Hulstein, M.F.E. & Van der Meer, R. (2001). Bactericidal activities of milk lipids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 1298-1301.
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Meulemans, G., Pasmans, F., Velge, P., Bottreau, E., Haesebrouck, F. & Ducatelle, R. (2003). Invasion of *Salmonella* Enteritidis in avian intestinal epithelial cells *In vitro* is influenced by short-chain fatty acids. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 237-248.
- Van Immerseel F, De Buck J, De Smet I, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R. Interactions of butyric acid- and acetic acid-treated *Salmonella* with chicken primary cecal epithelial cells *in vitro*. *Avian Dis.* 2004a Apr-Jun;48(2):384-91.
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Boyen, F., Bohez, L., Pasmans, F., Volf, J., Sevcik, M., Rychlik, I., Haesebrouck, F. & Ducatelle, R. (2004b). Medium-chain fatty acids decrease colonization and invasion shortly after infection with *Salmonella* Enteritidis in chickens through hila suppression. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3582-3587.
- Wales AD, Davies RH, *Salmonella* contamination of cereal ingredients for animal feeds. *Vet Microbiol.* 2013 Oct 25;166(3-4):543-9.
- Wales A.D. and Davies R.H. Investigations into *Salmonella* contamination in poultry feedmills in the United Kingdom. *Journal of Applied Microbiology* 109 (2010) 1430–1440.
- Wales A.D., Ian McLaren, André Rabie, Rebecca J. Gosling, Francesca Martelli, Robin Sayers, Robert Davies (2013) Assessment of the anti-*Salmonella* activity of commercial formulations of organic acid products, *Avian Pathology*, 42:3, 268-275.

Wales A.D., Vivien M. Allen, and Robert H. Davies. Chemical Treatment of Animal Feed and Water for the Control of Salmonella Foodborne Pathogens and Disease. January 2010, 7(1): 3-15.

Wierup M, Häggblom P. An assessment of soybeans and other vegetable proteins as source of Salmonella contamination in pig production Acta Vet Scand. 2010 Feb 17;52:15.

Xu H, Lee HY, Ahn J. Lett Appl Microbiol. Cross-protective effect of acid-adapted Salmonella enterica on resistance to lethal acid and cold stress conditions. 2008 Oct;47(4):290-7.

Zgurskaya HI, Krishnamoorthy G, Ntrel A, Lu S. Mechanism and Function of the Outer Membrane Channel TolC in Multidrug Resistance and Physiology of Enterobacteria. Microbiol. 2011 Sep 16;2:189.

### **Formaldéhyde**

Afssa (2004) Evaluation des risques liés à l'utilisation du formaldéhyde en alimentation animale. <http://www.afssa.fr/Documents/ALAN-Ra-formaldehyde.pdf>

Buckley KE, Fisher LJ and Mackay VG, 1988. Levels of formaldehyde in milk, blood, and tissues of dairy cows and calves consuming formalin-treated whey. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36, 1146-1150.

Carrique-Mas J.J., Bedford S., Davies R.H. (2007). Organic acid and formaldehyde treatment of animal feeds to control Salmonella: efficacy and masking during culture. J Appl Microbiol. 103:88.

Casanova M, Heck HD, Everitt JI, Harrington WW Jr, Popp JA. 1988. Formaldehyde concentrations in the blood of rhesus monkeys after inhalation exposure. Food and Chemical Toxicology, 26, 715-716.

Davison S, Benson C.E., Munro D.S., Rankin S.C., Ziegler A.E., Eckroade R.J. (2003). The role of disinfectant resistance of Salmonella enterica serotype enteritidis in recurring infections in Pennsylvania egg quality assurance program monitored flocks. Avian Dis. 47:143.

Dhareshwar SS and Stella VJ, 2008. Your prodrug releases formaldehyde: should you be concerned? No! Journal of Pharmaceutical Sciences, 97, 4184-4193.

EFSA (2008). Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals. EFSA Journal (2008) 720, 3-84

EFSA (2014a). Scientific Opinion on the safety and efficacy of formaldehyde for all animal species based on a dossier submitted by Regal B.V. EFSA Journal 12:3561.

EFSA (2014b) Scientific Opinion on the safety and efficacy of formaldehyde for all animal species based on a dossier submitted by Adiveter S.L. EFSA Journal 12:3562.

Gradel, K.O., Randall L., Sayers A.R., Davies R.H. (2005). Possible associations between Salmonella persistence in poultry houses and resistance to commonly used disinfectants and a putative role of *mar*. Veterinary Microbiology 107 (2005) 127-138.

Heck HD, White EL and Casanova-Schmitz M, 1982. Determination of formaldehyde in biological tissues by gas-chromatography mass-spectrometry. Biomedical Mass Spectrometry, 9, 347-353.

Heck HD, Casanova-Schmitz M, Dodd PB, Schachter EN, Witek TJ and Tosun T, 1985. Formaldehyde (CH<sub>2</sub>O) concentrations in the blood of humans and Fischer-344 rats exposed to CH<sub>2</sub>O under controlled conditions. Am Ind Hyg Assoc J. 46, 1-3.

Piérre et al., 2013

Preston TR, Rattray RE and White F, 1960. Effect of feeding formalin-treated skim milk to calves. Animal Production, 2, 33-36.

Rutala et al., (2008).

SCAN (2001). Reply by Anitox Ltd to complementary information requested (June 2001) by the Scientific Committee on Animal Nutrition on the use of formaldehyde as a preserving agent for pig and poultry feedingstuff (November 2001)

Wiernusz C. (2013). Controlling Salmonella in the feed. 2013 Arkansa Nutrition Conference, September 3-5, Rogers, Arkansas.

Davin-Regli A, Chollet R, Bredin J, Chevalier J, Lepine F, Pagès JM. Enterobacter gergoviae and the prevalence of efflux in parabens resistance. J Antimicrob Chemother 2006; 57:757-60.

DG Sanco (2009). Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR). [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_scenihr/docs/scenihr\\_o\\_021.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_021.pdf)

DG Sanco (2010). Preliminary opinion on triclosan: Antimicrobial Resistance. Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). [http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/consumer\\_safety/docs/sccs\\_o\\_023.pdf](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_023.pdf)

Kummerle N., Feucht H.H. and Kaulfers P.M. (1996). Plasmid-mediated formaldehyde resistance in Escherichia coli: characterization of resistance gene. Antimicrob Agents Chemother. 10:2276-2279.

Sondossi M, Rossmoore HW, Wireman JW. (1985). Observations of resistance and cross-resistance to formaldehyde and a formaldehyde condensate biocide in pseudomonas aeruginosa. Int Biodeter 21:105-106.

Ferrarese L, Paglia R, Ghirardini A. (2003). Bacterial resistance in cosmetics industrial plant: connected problems and their solution. Ann. Microbiol. 53:477-490.

### Huiles essentielles

- Al-Mariri A, Swied Gh, Oda A, Al Hallab L. 2013. Antibacterial activity of *Thymus Syriacus* Boiss essential oil and its components against some Syrian Gram-negative bacteria isolates. *Iran J. Med. Sci.*, 38(2):180-186.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., Anackov, G., 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some *lamiaceae* spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1822-1828.
- Bruneton J. 1993. Pharmacognosie Phytochimie plantes Médicinales, Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 915 p.
- Budavari S., O'Neil M.J., Smith A. 1996. The Merk Index. twelfth ed., Whitehouse Station: Merk and Co., INC, 2350 p.
- Burt, S. A., R. D. Reinders. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology* 36:162-167.
- Carson, C. F., B. D. Cookson, H. D. Farrelly, T. V. Riley. 1995. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 35:421-424.
- Carson, C. F., B. J. Mee, T. V. Riley. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:1914-1920.
- Ciani M, Menghini L, Mariani F, et al., 2000. Antimicrobial properties of essential oil of *Satureja montana* L. on pathogenic and spoilage yeasts. *Biotechnol. Lett.*, 22(12): 1007-1010.
- Cimanga K, Kambu K, Tona L, et al., (2002) Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol* 79, 213-220.
- Cosentino, S., C. I. G. Tuberoso, B. Pisano, M. Satta, V. Mascia, E. Arzedi, F. Palmas. 1999. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29:130-135.
- Cox, S. D., C. M. Mann, J. L. Markham, H. C. Bell, J. E. Gustafson, J. R. Warmington, S. G. Wyllie. 2000. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88:170-175.
- Davidson, P. M. 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds, p. 520-556. *In* M. P. Doyle, L. R. Beuchat, T. J. Montville (ed.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. ASM Press, Washington.
- Denyer, S. P., W. B. Hugo. 1991a. Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane, p. 171-188. *In* S. P. Denyer and W. B. Hugo (ed.), *Mechanisms of action of chemical biocides*. The Society for Applied Bacteriology, Technical Series No 27. Oxford Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- Denyer, S. P., W. B. Hugo. 1991b. Mechanisms of antibacterial action - A summary, p. 331-334. *In* S. P. Denyer and W. B. Hugo (ed.), *Mechanisms of action of chemical biocides*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Dipasqua R., De Feo V., Villani F., Mauriello G. 2005. *in vitro* antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean *Apiaceae*, *Verbenaceae* and *Lamiaceae* against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Ann. Microbiol.*, 5(2): 139-143.
- Dobre A.A., Niculita P. 2012. Antibacterial profile of essential oils against pathogen bacteria. *Bull. agriculture*, 69: 255-261.
- Dorman, H. J. D., S. G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88:308-316.
- Elgayyar, M., F. A. Draughon, D. A. Golden, J. R. Mount. 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection* 64:1019-1024.
- Ekren S., Yerlikaya O., Tokul H.E., Akpinar A., Açu M. 2013. Chemical composition, antimicrobial activity and antioxidant capacity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Afric. J. Microbiol. Res.*, 75: 383-388.
- Farag, R. S., Z. Y. Daw, F. M. Hewedi, G. S. A. El-Baroty. 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection* 52:665-667.
- Gustafson, J. E., Y. C. Liew, S. Chew, J. L. Markham, H. C. Bell, S. G. Wyllie, J. R. Warmington. 1998. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 26:194-198.
- Helander, I. M., H.-L. Alakomi, K. Latva-Kala, T. Mattila-Sandholm, I. Pol, E. J. Smid, L. G. M. Gorris, A. Von Wright 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:3590-3595.
- Höld K.M., Sirisoma N.S., Ikeda T. 2000.  $\alpha$ -Thujone (the active component of absinthe): X-aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *PNAS*, 97(8): 3826-3831.
- Hooser S.B. 1990. D-limonene, linalool, and crude citrus oil extracts. *Veterinary Clinics of North America: Small Practice*, 20: 383-385.
- Juliano, C., A. Mattana, M. Usai. 2000. Composition and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research* 12:516-522.
- Juven, B. J., J. Kanner, F. Schved, H. Weisslowicz. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology* 76:626-631.
- Karatzas AK, Kets EPW, Smid EJ, Bennik MHJ. 2001. The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Appl. Microbiol.*, 90: 463-469.
- Kim J, Marshall MR, Wei C (1995) Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J Agric Food Chem* , 43, 2839-2845.

- Knight M.J., Hansen S.R., Buck W.B. 1994. Toxicity of *Melaleuca* oil and related essential oils applied topically on dogs and cats. *Vet. Human Toxicol.*, 36(2): 139-142.
- Knobloch, K., A. Pauli, B. Iberl, H. Weigand, N. Weis. 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research* 1:119- 128.
- Knobloch, K., H. Weigand, N. Weis, H.-M. Schwarm, H. Vogenschow. 1986. Action of terpenoids on energy metabolism, p.429-445. In E. J. Brunke (ed.), *Progress in Essential Oil Research: 16th International Symposium on Essential Oils*. De Gruyter, Berlin.
- Lambert, R. J. W., P. N. Skandamis, P. Coote, G.-J. E. Nychas. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91:453-462.
- Longaray-Delamare AP, Moschen-pistorello IT, Artico L, et al., 2007 Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chem* 100, 603-608.
- Lopez V., Lindsay R.C. 1993. Metabolic conjugates as precursors of characterising flavor compounds in ruminant milks. *J. Agric. Food Chem.*, 41 : 446-454.
- Mann, C. M., J. L. Markham. 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology* 84:538-544.
- Mejholm O, Dalgaard P. 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Lett. Appl. Microbiol.*, 34: 27-31.
- Miladi H., ben Slama R., Mili D., Zouari S., Bakhrouf A., Ammar E. 2013. Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Natural Science*, 5(6): 729-739.
- Mourey, A., N. Canillac. 2002. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control* 13:289-292.
- Moussaoui N., Sanchez G., Khay E.O., Idaomar M., Ibn Mansour A., Abrini J., Aznar R. 2009. Antibacterial and antiviral activities of essential oils of northern Moroccan plants.
- Oosterhaven, K., B. Poolman, E. J. Smid. 1995. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Industrial Crops and Products* 4:23-31.
- Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M (2007) Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18, 414-420.
- Pol, I. E., H. C. Mastwijk, R. A. Slump, M. E. Popa, E. J. Smid. 2001. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment and carvacrol. *Journal of Food Protection* 64:1012-1018.
- Roldan L.P., diaz G.J., Durringer J.M. 2010. Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the *Lamiaceae* family against pathogenic and beneficial bacteria. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu*, 23: 451-461.
- Roller S, Seedhar P. 2002. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4 °C and 8°C. *Lett. Appl. Microbiol.*, 35: 390-394.
- Salvat, A., L. Antonnacci, R. H. Fortunato, E. Y. Suarez, H. M. Godoy. 2001. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology* 32:293-297.
- Sikkema, J., J. A. M. De Bont, B. Poolman. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* 269:8022-8028.
- Sikkema, J., J. A. M. De Bont, B. Poolman. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59:201-222.
- Skandamis, P., K. Koutsoumanis, K. Fasseas, G.-J. E. Nychas. 2001. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Italian Journal of Food Science* 13:65-75.
- Sokovic M, Marin P.D., Brkic D., van Griensven L.J.L.D. 2007. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of tenaromatic plants against human pathogenic bacteria. *Food, Global Science Books*.
- Takada M., Agata I., Sakamoto M, Yagi N., Hayashi N. 1979. On the metabolic detoxication of thymol in rabbit and man. *J. Toxicol. Sci.* 4 : 341-350.
- Thoroski, J., G. Blank, C. Billaderis. 1989. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection* 52:399-403.
- Tsigarida E, Skandamis P, Nychas GJE. 2000. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C. *J. Appl. Microbiol.*, 89: 90-909.
- Ultee, A., M. H. J. Bennink, R. Moezelaar. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1561-1568.
- Ultee, A., E. P. W. Kets, M. Alberda, F. A. Hoekstra, E. J. Smid. 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology* 174:233-238.
- Ultee, A., E. P. W. Kets, E. J. Smid. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65:4606- 4610.

Ultee, A., E. J. Smid. 2001. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. International Journal of Food Microbiology 64:373-378.  
 Wendakoon, C. N., M. Sakaguchi. 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. Journal of Food Protection 58:280-283.  
 Wichitl M., Anton R. 1999; Plantes thérapeutiques, Technique et Documentation, Paris.

**ANNEXE(S)**

**Annexe 1**

De EFSA Journal 2012;10(3):2597

*Table SA28. Salmonella in animal and vegetable derived feed material, 2008-2010*

EU Totals	2010		2009		2008	
	N	% pos	N	% pos	N	% pos
Fish meal	1,818	9.1	1,362	0.7	1,688	2.1
Meat and bone meal	5,436	0.6	6,015	1.4	8,399	1.0
Cereals	3,035	0.9	3,633	0.4	5,262	0.2
Oil seeds and products	11,683	1.5	10,720	1.3	18,786	1.8

Note: Data are presented only for sample sizes ≥25.

De Papadoupouloet al 2009

**TABLE 3: Distribution of *Salmonella* serovars of designated EU public health significance in animal feedingstuffs in Great Britain in 1987 to 2006**

	S Enteritidis	S Typhimurium	Serovar S Hadar	S Infantis	S Virchow
Ingredients					
Barley	3	9	0	0	1
Cocoa	1	1	0	0	1
Fishmeal	5	17	2	7	3
Linseed	0	1	1	0	0
Meat and bone meal	10	7	2	16	2
Maize	2	5	0	9	0
Oats	0	2	0	0	0
Palm kernel	3	2	0	0	0
Rape	4	11	1	6	0
Soya	1	20	3	68	10
Rice bran	1	4	0	0	0
Sunflower	5	2	0	4	2
Wheat	6	43	7	6	5
Cotton	2	0	1	4	0
Protein	1	0	0	0	0
Environment	2	12	15	0	1
Unspecified	15	63	9	42	3
Total	61	199	41	162	28
Compound feed for					
Poultry	16	46	13	21	10
Cattle	0	19	1	9	4
Sheep	0	1	0	0	1
Pigs	0	47	0	8	2
Unspecified	26	49	7	19	14
Total	42	162	21	57	31

## Annexe 2

### Suivi des actualisations de l'avis

Date	Version	Page	Description des modifications
27/06/2014	01		Première version
16/09/2014	02	P 5	Remplacement de la phrase : « Certains Etats membres incluent dans leur stratégie de maîtrise une gestion stricte du risque de contamination dès la production d'aliments pour animaux (Suède, Finlande) ; ces pays présentent les prévalences nationales les plus faibles » par « Certains Etats membres incluent dans leur stratégie de maîtrise une gestion stricte du risque de contamination dès la production d'aliments pour animaux associée à des mesures de biosécurité (Suède, Finlande) ; ces pays présentent les prévalences nationales parmi les plus faibles »
		P5	Remplacement de la phrase : « Dans le contexte de mondialisation des marchés de distribution des matières premières, les données des rares pays qui réalisent une surveillance permettent d'avoir une bonne image de la contamination par <i>Salmonella</i> des matières premières » par « Dans le contexte de mondialisation des marchés de distribution des matières premières, les données des rares pays qui réalisent une surveillance permettent d'avoir une image de la contamination par <i>Salmonella</i> des matières premières, dépendant des conditions d'échantillonnage variables en fonction du temps et des pays considérés »
		P7	Remplacement du titre : « Paramètres pertinents utilisés pour mesurer leur efficacité et facteurs influençant » par « Paramètres utilisés pour mesurer leur efficacité et facteurs influençant »